



HAL
open science

Mécanismes moléculaires et cellulaires de la “ mémoire neurochimique ” induite par la morphine et perspectives thérapeutiques

Hélène Geoffroy

► **To cite this version:**

Hélène Geoffroy. Mécanismes moléculaires et cellulaires de la “ mémoire neurochimique ” induite par la morphine et perspectives thérapeutiques. Pharmacologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCB168 . tel-04483957

HAL Id: tel-04483957

<https://theses.hal.science/tel-04483957>

Submitted on 29 Feb 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Paris Descartes
Ecole doctorale 563, Médicament, Toxicologie, Chimie et Imagerie

Unité Inserm UMR-S 1124, CNRS ERL 3649, Laboratoire de Toxicologie, Pharmacologie et
Signalisation Cellulaire
Équipe Neuroplasticité et thérapies des addictions

Mécanismes moléculaires et cellulaires de la « mémoire neurochimique » induite par la morphine et perspectives thérapeutiques

Thèse de doctorat de pharmacologie présentée par

Hélène GEOFFROY

Dirigée par : Dr Florence NOBLE

Composition du jury :

Pr Mickaël Naassila	Université de Picardie Jules Vernes	Rapporteur
Dr Anne Bérod	Université Claude Bernard Lyon 1	Rapporteur
Pr Mehrnaz Jafarian-Tehrani	Université Paris Descartes	Examineur
Pr Michel Hamon	Université Pierre et Marie Curie	Examineur
Pr Catherine Marchand-Leroux	Université Paris Descartes	Examineur
Dr Florence Noble	Université Paris Descartes	Directeur de thèse



Except where otherwise noted, this work is licensed under
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Résumé (français) :

L'addiction est une maladie psychiatrique aux conséquences lourdes dans nos sociétés modernes tant d'un point de vue économique que de santé publique. Lors du sevrage après un traitement chronique, des adaptations à long terme se mettent en place au niveau neurochimique et morphologique. Les épisodes de rechutes subsistent, même après de longues périodes d'abstinence.

Le but de ce travail de thèse a été de caractériser des adaptations qui se mettent en place à court et long terme dans le noyau accumbens (Nac) lors du sevrage après un traitement chronique à la morphine (10 mg/kg, s.c., 1 fois par jour pendant 14 jours). Nous nous sommes intéressés en particulier aux altérations ayant lieu spécifiquement à l'heure où les animaux avaient l'habitude de recevoir l'injection de morphine, par rapport à une autre heure de la journée. Nous avons mis en évidence une augmentation spontanée de dopamine extracellulaire dans le Nac au 1^{er} et au 14^{ème} jour d'arrêt du traitement, spécifiquement au moment où les rats recevaient l'injection de morphine, par rapport à une autre heure dans la journée. Il pourrait s'agir d'une anticipation du caractère renforçant positif de la drogue, conditionnée par l'heure de la prise de morphine. Des modifications dans la morphologie des neurones ont également été observées dont notamment une diminution de la densité des épines dendritiques spécifiquement dans les neurones épineux moyens du *core* du Nac à l'heure habituelle d'injection de morphine au 1^{er} jour de sevrage. Ceci est en partie dépendant du stress induit par les injections car une augmentation de la densité des épines est observée lorsqu'une adrénalectomie est réalisée avant le début des traitements à la morphine. Parallèlement, nous nous sommes intéressés à la signalisation d'une neurotrophine impliquée dans les phénomènes de mémoire et d'apprentissage, le BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor). Quatorze jours après l'arrêt des traitements, la signalisation du BDNF (les protéines de BDNF mature, le proBDNF, l'isoforme tronquée du récepteur TrkB.T1) augmente spontanément à l'heure habituelle d'injection de morphine par rapport à une autre heure de la journée, dans le *core* du Nac. L'augmentation de BDNF est retrouvée au niveau périphérique, au 1^{er} et au 14^{ème} jour de sevrage à l'heure habituelle d'injection de morphine, par rapport à une autre heure de la journée. Au niveau périphérique, nous avons montré que les variations de BDNF étaient spécifiques de la cocaïne et de la morphine et que le phénomène ne se généralise pas à une récompense naturelle.

L'ensemble de ces résultats attire l'attention sur l'importance des modifications spontanées qui se mettent en place au cours du sevrage à l'heure habituelle d'injection de drogue et qui perdurent dans le temps. L'heure habituelle de consommation de la drogue constitue peut-être une fenêtre de temps où les individus abstinentes seraient plus vulnérables à la rechute, ceci pouvant être quantifiable objectivement via des mesures régulières du taux de BDNF périphérique.

Mots clés (français) : BDNF, morphine, épines dendritiques, dopamine

Title: Cellular and molecular mechanisms of the « neurochemical memory » induced by morphine and clinical issues

Abstract:

Addiction is a psychiatric disease with far-reaching consequences in our western countries both in economical and public health issues. Chemical and morphological alterations are observed in the brain during withdrawal following a chronic drug of abuse treatment. Even after a protracted abstinence, relapse to drug-seeking and drug-taking occurs.

The aim of this research was to characterize the short and long term-alterations that took place in the nucleus accumbens (Nac) during withdrawal following a chronic morphine treatment (10 mg/kg, s.c., once a day during 14 days)

We particularly focused our attention on the alterations that occurred specifically at the usual hour of morphine injection, compared to another hour of the day. We have stressed an increase of spontaneous extracellular dopamine in Nac on the 1st (WD1 for withdrawal day 1) and the 14th day (WD14 for withdrawal day 14) after the end of the treatment, especially at the time where rats were used to receive morphine, compared to another time of the day. This may reflect a neurochemical anticipatory response to the rewarding effects of morphine, which is a time-dependent conditioned response that mimics the effect of the drug, only at the usual hour of injection.

Morphological alterations of accumbal neurons were also observed. On the 1st day of withdrawal, we reported a decrease of dendritic spine density of medium spiny neurons in the Nac core at the usual hour of injection compared to a basal level, measured at another time of the day. This is partly due to the stress induced by injections as an increase of dendritic spine density was reported when adrenalectomy was performed before the beginning of morphine treatment. In parallel, we also focus on the signaling pathway of a particular neurotrophin involved in learning and memory, called BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor). Fourteen days after the end of the treatment, the BDNF signaling pathway (mature BDNF, proBDNF and the truncated isoform the TrkB receptor proteins) increase at the usual hour of morphine injection compared to another hour of the day in the Nac core.

We also found an increase in peripheral BDNF level, on WD1 and WD14 at the usual time of injection compared to another time of the day. We demonstrated that those peripheral BDNF alterations were specific of drugs of abuse (cocaine and morphine) as no alterations were reported with a natural reward (a butter biscuit).

Taken together, these results shed light into the importance of the long- term alterations that take place during withdrawal at the usual time of drug injection. The hour at which an individual consumes drugs of abuse may constitute a time-window where abstinent patients may be more prone to relapse. This phenomenon may be objectively quantified by regular monitoring of peripheral BDNF level.

Keywords: BDNF, morphine, dendritic spine, dopamine

REMERCIEMENTS

« Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries. » Marcel Proust

En premier lieu, je remercie Monsieur **le Professeur Mickael Naassila** et **Madame le Docteur Anne Béro**d qui ont accepté d'évaluer ce travail de thèse en tant que rapporteurs. Merci également à **Madame le Professeur Catherine Marchand-Leroux**, **Madame le Professeur Mehrnaz Jafarian** et **Monsieur le Professeur Michel Hamon** de participer à mon jury de thèse. Je suis ravie et honorée que chacun de vous ait accepté de faire partie de mon jury de soutenance.

Je ne remercierai jamais assez le **Professeur Bernard Francès** de m'avoir conseillé de vous contacter, **Florence**, à la fin de mon stage de master 1. Merci de m'avoir accueillie au labo, et de me permettre d'y rester encore quelques temps en ayant cherché toutes les possibilités de financements existantes ! Ces 3 ans et demi dans l'équipe ont été une expérience exceptionnelle. J'ai énormément apprécié l'indépendance que vous m'avez laissée et la confiance que vous avez eue en moi. Malgré les responsabilités que vous avez en dehors de l'équipe, vous avez toujours, sans aucune exception, été disponible et prête à discuter. Votre implication n'a jamais failli, y compris week-end et jour fériés ! Un grand merci pour cet encadrement qui m'a fait grandir. Quoi qu'il se passe dans mon avenir professionnel, ces années resteront d'une richesse inoubliable dans lesquelles vous avez été un moteur. Outre vos qualités scientifiques, je veux également vous remercier pour vos qualités humaines, parmi lesquelles votre bonne humeur, votre écoute et votre discrétion. Un grand merci pour tout cela. Je vous souhaite le meilleur pour les années à venir, je sais que les idées de projets ne manqueront pas !

Voisine de bureau, collègue, mais surtout amie, un immense merci **Magalie**. En rédigeant mon mémoire de master, j'écrivais que tu étais un modèle pour moi. Cela a toujours autant de sens aujourd'hui, j'espère toujours pouvoir ressembler à la chercheuse brillante que tu es. Tu as les qualités que j'admire le plus chez un chercheur : l'humilité et la remise en question. Tes valeurs, ton sens du travail, ta rigueur et ton envie de comprendre jusqu'au dernier détail ont été des exemples quotidiens et je t'en remercie sincèrement. Plus personnellement, compte tenu de tous les points communs que l'on partage, je me plais à croire que notre rencontre n'est pas un hasard. Les mots me manquent pour exprimer l'amitié profonde que je te porte. Ton regard bienveillant et impliqué m'a fait grandir à tout point de vue. Bien au-delà de ces quelques années au labo, je voudrais que tu saches que tu es ma plus belle rencontre.

Corinne, je vais regretter nos présences seules au labo pendant les vacances « scolaires ». Tu m'as appris beaucoup de choses, tous les « petits trucs » indispensables grâce auxquels on avance sans perdre de temps. Artiste, électron libre, tu invites à des réflexions ouvertes qui élèvent l'esprit. Ton amitié m'est précieuse, et j'ai à cœur de te prouver que même si « on ne connaît jamais vraiment les gens », certaines amitiés ne tombent pas dans l'oubli ;) En attendant, un nouveau projet auto-ad nous attend, et j'ai hâte de travailler de nouveau avec toi !

Nicolas, je te remercie de m'avoir apporté l'expertise que tu as concernant les épines et les protéines. Ton avis sur les protocoles et les résultats a toujours été important et je continuerai à te solliciter ! Grâce à ton

humour, les journées perf's m'ont semblées moins longues ! Pour le futur, le Toucan n'a qu'à bien se tenir ;)

Zuzana et Isabella, les filles, bon courage pour la fin de votre thèse que je vous souhaite excellente et fructueuse. Je vous souhaite de réaliser vos projets professionnels respectifs et que votre vie soit épanouie à tous égards.

Je voudrais remercier **toute l'équipe enseignement de pharmacologie** avec qui j'ai eu la chance de travailler pendant 3 ans. Merci **Catherine**, de m'avoir accueillie chaleureusement pour cette mission et pour m'avoir fait confiance. **Valérie et Dominique**, vos encouragements ont été d'une grande aide. Les dures premières séances de TP de SNA, dans lesquelles j'ai perdu 3L d'eau par heure, rougis chroniquement et perdu ma voix dans des tremblements obscurs, m'ont fait douter de mon engagement en enseignement. Votre soutien m'a énormément touché et vraiment donné confiance, cela n'a pas de prix. **Claire, Raymond et Virginie**, c'était chouette de faire les séances de TP avec vous. Chacun à votre manière vous êtes des exemples, cette ambiance et ces enseignements vont vraiment me manquer !

Maria, Amina, Véronique, Bruno, Virginie, René, Sophie, Séverine, Théo, Alain, Thomas, Chantal, Lucas, Mickaël, Salvatore, Ismaïl, Ihsanne, Mr Roques, Stéphanie, Andréas, Charlaïne, nous avons passé de bons moments autour d'un bon resto, d'un café, d'un goûter, d'une raclette ou d'une galette. Merci pour votre bonne humeur et votre gentillesse. Au-delà du travail au labo, ces moments là sont importants et je les ai vraiment appréciés.

Je remercie mes amies parisiennes qui ont égaillé soirées et week-end, **Lulu et Julie**, les filles, vous êtes TOP, disponibles et compréhensives, j'ai de la chance de vous avoir ! Vive les indigestions de shirashis, les smoothies Cojean post-piscine et la gym suédoise ;)

A celles et ceux qui m'ont rendus visites et inversement proportionnel, **Thomas, Elodie et Lucas, Mimie, Salim, Tya, Mao et Dominique, Benji & Mana, Keumille, Prit chou, Nerwan, Romain et J-R, Nanus, Julien & Swan, Minidou & Kikile, Geneviève & Philippe** merci les amis ! Je souhaite que l'avenir nous réserve plein d'autres bons moments ensemble ! Merci également à **Anne-Marie et Patrick**, pour cette semaine de rêve sous le soleil de Perros ! Je rêve encore de pique-niques sur le bateau et de pêche à pieds...

Grand cru du master 2013 de Poitiers, futurs **Drs Fouyfouy et Genty**, je vous souhaite, au-delà du plan personnel, la belle et longue carrière scientifique que vous méritez. Nous n'aurons eu que peu d'occasions de nous voir pendant ces 3 ans, mais c'était *#tropcool #surpriseinCambridge #changezrienetmoquezvous !*

Last but not least, **ma chouquette**, tu mériterais l'écriture d'une thèse tellement tu es importante. Ton intégrité et ta sincérité sont des plus louables. Tu es l'amie que tout le monde rêve d'avoir, et je suis

comblée de t'avoir dans ma vie depuis plus de 10 ans. Barcelone, Amsterdam, la Croatie, ... on a toute la vie pour faire le reste et je m'en réjouie d'avance ! Je te remercie d'avoir toujours été là, d'avoir partagé les bons et les mauvais moments et de prendre le temps pour chacun d'eux. Longue vie à nos débriefs autour de charcut', vins & fromages !

Comme tu l'as souvent dit **maman**, on est riche de ce que l'on est, pas de ce que l'on possède. Je voudrais vous remercier, **papa** et toi, de m'avoir transmis des valeurs importantes qui ont construit ma vie d'adulte. Je vous remercie pour votre soutien, votre amour et votre confiance qui me sont chers et qui m'ont porté pendant cette thèse. Merci aussi à toute ma famille chez qui je me suis fait chouchouter pendant les *week end OFF* ces 3 dernières années (sans compter les 24 autres années avant !). **Papi Christian & Marie-Claire, Mamie Cot' & Mimi, Tata Christine, Jean Michel et Damien**, vous êtes extraordinaires, votre amour, vos qualités et vos valeurs m'ont rendu riche pour la vie.

Enfin, je crois avoir fait la plus belle des découvertes pendant cette dernière année de thèse. Quel bonheur de t'avoir rencontré **Romain** ... Merci d'être si bien au quotidien, de m'apporter tout ce dont je pouvais rêver et même plus, et pour tous ces bons moments passés ensemble. Je les espère encore riches et nombreux, et c'est un euphémisme...

J'ai envie de m'autoriser une citation de Montaigne pour conclure, « parce que c'était vous, parce que c'était moi ». Parce que c'est un peu de vous tous que je suis aujourd'hui, parce que ma vie s'est nourrie de vos rencontres, professionnelles et personnelles, m'a permis et me permets de me construire quotidiennement.

Vous êtes mon équilibre, et je vous en remercie.

TABLE DES MATIÈRES

Liste des publications.....	13
Tables des illustrations, tableaux et encadrés	15
Principales abréviations	17
Avant-propos.....	18
Introduction.....	19
Chapitre 1 : l'addiction : de la définition de la maladie vers la neurobiologie.....	20
Définition et critères diagnostiques.....	20
Prévalence de l'addiction	23
La vulnérabilité à l'addiction.....	23
Le circuit de la récompense et les substrats biologiques de l'addiction	26
Les neurotransmetteurs impliqués dans le système de récompense	28
La dopamine	28
Le glutamate.....	30
Le GABA.....	33
Anatomie du circuit de la récompense	35
Souvenirs et anticipation des récompenses	39
Chapitre 2 : la neuroplasticité induite par les opioïdes.....	41
Neuropharmacologie des opiacés	41
Présentation générale	41
Propriétés pharmacologiques de la morphine.....	42
Métabolisme de la morphine :	42
Les opioïdes endogènes.....	43
Les récepteurs aux opioïdes	44
Effets d'un traitement aigu aux opioïdes.....	47
Dans le noyau accumbens.....	47
Dans l'aire tegmentale ventrale.....	47
Effets d'un traitement chronique aux opioïdes	48
Superactivation de l'adénylate cyclase	48

Notion de tolérance	49
La tolérance aux opio�ides	49
Régulation du nombre de récepteurs en surface	49
Désensibilisation des récepteurs et phosphorylation	50
Endocytose	50
Activation des systèmes anti-opio�ides.....	50
Tolérance : le cas particulier de la morphine.....	51
La désensibilisation du récepteur	51
L'endocytose du récepteur.....	52
Effets d'un traitement chronique dans le noyau accumbens.....	53
Effets d'un traitement chronique dans l'aire tegmentale ventrale.....	53
Sevrage	55
Dans le noyau accumbens.....	55
Dans l'aire tegmentale ventrale.....	57

Chapitre 3 : le BDNF

Découverte et définition	59
Le gène du BDNF : structure et régulation	59
Du proBDNF vers le BDNF mature	62
Synthèse et stockage intracellulaire.....	62
Le clivage.....	63
Clivage intracellulaire et stockage	63
Clivage extracellulaire	63
Rôles du tPA.....	64
Lien tPA et dépendance	65
Le transport	66
La sécrétion.....	66
Les récepteurs du BDNF.....	67
Le récepteur à activité tyrosine kinase TrkB.....	67
Composition	68
Localisation	69
Modifications post-traductionnelles.....	69
Cascades de signalisation intracellulaire.....	69

Le devenir du complexe BDNF-TrkB	72
Fonction physiologique du BDNF	74
Au niveau central.....	74
Plasticité synaptique	75
Phase précoce de la potentialisation à long terme	75
Phase tardive de la potentialisation à long terme	76
Dépression à long terme.....	76
BDNF et fonctions cognitives	76
Au niveau périphérique	77
Régulation du BDNF dans l'addiction	78
Les études chez l'animal	78
Augmentation des taux de BDNF.....	78
Diminution de BDNF	79
Régulations épigénétiques du BDNF	80
Abstinence prolongée, incubation et craving	80
Le BDNF endogène	80
Le BDNF exogène	81
Les études chez l'homme	82
Un biomarqueur potentiel ?	82
Nicotine	82
Alcool.....	83
Héroïne.....	83
Cocaïne	84

Objectif général de la thèse **85**

Résultats **87**

Objectif 1 : étude des modifications de la signalisation du BDNF induites après un traitement chronique à la morphine	88
Méthodologie liée à l'objectif 1	89
Conséquences d'un traitement chronique à la morphine 14 jours après la dernière injection.....	93
Dans le noyau accumbens core	93
Dans le noyau accumbens shell	95
Conséquences d'un traitement chronique à la solution saline lors de l'anticipation des injections	97

Dans le noyau accumbens core	97
Dans le Noyau accumbens shell	99
Conséquences d'un traitement chronique à la morphine lors de l'anticipation des injections.....	101
Dans le noyau accumbens core	101
Dans le noyau accumbens shell	103
Résumé des résultats obtenus dans l'objectif 1	105
Discussion partielle des résultats obtenus dans l'objectif 1	106
Objectif 2 : Étude des modifications des neurotransmetteurs dopamine, glutamate et GABA induites après un traitement chronique à la morphine.....	111
Méthodologie liée à l'objectif 2	112
Conséquences d'un traitement chronique à la morphine	115
Bilan neurochimique au 1 ^{er} jour de sevrage.....	115
Bilan neurochimique au 14 ^{ème} jour de sevrage.....	116
Conséquences d'un traitement chronique à la solution saline lors de l'anticipation des injections	117
Bilan neurochimique au 1 ^{er} jour de sevrage.....	117
Bilan neurochimique au 14 ^{ème} jour de sevrage.....	118
Conséquences d'un traitement chronique à la morphine lors de l'anticipation des injections.....	119
Bilan neurochimique au 1 ^{er} jour de sevrage.....	119
Bilan neurochimique au 14 ^{ème} jour de sevrage.....	120
Résumé des résultats obtenus dans l'objectif 2 :	121
Discussion partielle des résultats obtenus dans l'objectif 2 :	122
Objectif 3 : Etude des modifications morphologiques des neurones du noyau accumbens induites par un traitement chronique à la morphine.....	127
Résumé de l'article 1	127
Objectif 4 : Le BDNF pourrait-il être un bon biomarqueur de la rechute ? Étude préliminaire sur les variations périphériques de BDNF après différents traitements.....	139
Résumé de l'article 2	140
Discussion générale et perspectives	148
Bibliographie	154

Liste des publications

Publications :

Articles dans des revues internationales :

Geoffroy H A-S, Puig S, Benturquia N, & Noble F (2014). Temporal Regulation of Peripheral BDNF levels during Cocaine and Morphine Withdrawal: Comparison with a Natural Reward. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 18 (5)

Geoffroy H A-S, Canestrelli C, Marie N, Noble F, Time-dependent alterations of dendritic spines in the nucleus accumbens subregions: how stress and morphine differently modulate plasticity, *(en preparation)*

Geoffroy H A-S, Canestrelli C, Marie N, Noble F, Specific alterations of accumbal dopamine level during withdrawal from morphine *(en preparation)*

Geoffroy H A-S, Marie N, Noble F, Alterations of the BDNF signaling pathway during morphine withdrawal *(dernières expérimentations en cours)*

Publications dans des revues sans comité de lecture :

Geoffroy H A-S, Noble F, (2015), Is BDNF a good candidate biomarker for the relapse risk, *Le courrier des addictions*, Vol 17, n°4, p 9-11.

Chapitre de livre:

Geoffroy H A-S & Noble F, (sous presse), BDNF during withdrawal, (volume 104, In *Neurotrophins*; Academic Press/ Elsevier), Ed. Gerald Litwach.

Communications avec actes dans un congrès international :

Geoffroy H A-S, Marie, N., Canestrelli, C., & Noble, F. (2015). P.1.h.016 Impact of stress on neuronal plasticity in rats. *European Neuropsychopharmacology*, 25, S289–S290.

Geoffroy H A-S, Marie N, Noble F. (sous presse) Temporal regulation of BDNF level in the nucleus accumbens during morphine withdrawal in rats. *European Neuropsychopharmacology*.

Posters :

Geoffroy H A-S, Marie N, Canestrelli C, Noble F. Impact of stress on neuronal plasticity in rats, 28ème Collège Européen de Neuropsychopharmacologie, Amsterdam (Pays-Bas), 29 Aout-1er Septembre 2015

Geoffroy H A-S, Marie N, Canestrelli C, Noble F. Impact of stress on neuronal plasticity in rats, Journées de l'école doctorale Médicament Toxicologie Chimie Environnement, (Paris), Juin 2015.

Geoffroy H A-S, Puig S, Noble F, Benturquia N. Expectation induced by a chronic cocaine treatment : a behavioral and neurochemical study in rats, 11ème colloque de la Société des Neurosciences, Lyon (France), 22-24 Mai 2013.

Tables des illustrations, tableaux et encadrés

Figure 1 : Les différentes étapes dans la mise en place de l'addiction.....	21
Figure 2 : Probabilité de développer une dépendance parmi les usagers de drogues	24
Figure 3 : Biosynthèse (gauche) et métabolisme (droite) de la dopamine au niveau neuronal.....	29
Figure 4 : Représentation simplifiée d'une synapse glutamatergique tripartite	32
Figure 5 : Représentation simplifiée de la synthèse et du métabolisme du GABA	34
Figure 6 : Schéma du circuit de la récompense sur une coupe sagittale de cerveau de rongeur	35
Figure 7 : Les cibles d'action de différentes drogues	38
Figure 8: La glucuronidation de la morphine par l'enzyme UDP-glucuronyltransférase (UGT) 2B7	42
Figure 9 : Conséquence d'un traitement aigu aux opiacés :	46
Figure 10 : Plasticité cellulaire et moléculaire dans l'ATV et le Nac après un traitement chronique à la morphine	54
Figure 11 : Structure du gène du BDNF chez l'homme (A) et chez le rongeur (B)	60
Figure 12: Résumé du clivage protéolytique du proBDNF neuronal.....	64
Figure 13 : Les récepteurs à activité tyrosine kinase Trk.....	68
Figure 14: Représentation simplifiée de la cascade de signalisation BDNF- TrkB.....	70
Figure 15: Sécrétion, recapture et transport du BDNF au niveau synaptique	73
Figure 16 : Expression du proBDNF, BDNF mature, TrkB entier et tronqué et activation de la voie CREB après 14 jours de sevrage dans le noyau accumbens core	94
Figure 17: Expression du proBDNF, BDNF mature, TrkB entier et tronqué et activation de la voie CREB après 14 jours de sevrage dans le noyau accumbens shell	96
Figure 18 : Expression du proBDNF, BDNF mature, TrkB entier et tronqué et activation de la voie CREB après 14 jours d'arrêt des injections de solution saline dans le noyau accumbens core	98
Figure 19 : Expression du proBDNF, BDNF mature, TrkB entier et tronqué et activation de la voie CREB après 14 jours d'arrêt des injections de solution saline dans le noyau accumbens shell	100
Figure 20 : Expression du proBDNF, BDNF mature, TrkB entier et tronqué, tPA et activation de la voie CREB à l'heure habituelle d'injection de morphine après 14 jours d'arrêt du traitement dans le noyau accumbens core	102
Figure 21: Expression du proBDNF, BDNF mature, TrkB entier et tronqué et activation de la voie CREB à l'heure habituelle d'injection de morphine après 14 jours d'arrêt du traitement dans le noyau accumbens shell	104
Figure 22 : Principe de la microdialyse	112

<i>Figure 23 : Gammes étalons réalisées avec les standards de dopamine, glutamate et GABA</i>	<i>114</i>
<i>Figure 24 : Mesure des taux de dopamine, glutamate et GABA au 1^{er} jour de sevrage dans le noyau accumbens core.....</i>	<i>115</i>
<i>Figure 25 : Mesure des taux de dopamine, glutamate et GABA au 14^{ème} jour de sevrage dans le noyau accumbens core</i>	<i>116</i>
<i>Figure 26 : Mesure des taux de dopamine, glutamate et GABA au 1^{er} jour d'arrêt des injections de solution saline dans le noyau accumbens core</i>	<i>117</i>
<i>Figure 27 : Mesure des taux de dopamine, glutamate et GABA au 14^{ème} jour d'arrêt des injections de solution saline dans le noyau accumbens core</i>	<i>118</i>
<i>Figure 28 : Mesure des taux de dopamine, glutamate et GABA lors de l'anticipation des injections de morphine au 1^{er} jour d'arrêt du traitement dans le noyau accumbens core</i>	<i>119</i>
<i>Figure 29: Mesure des taux de dopamine, glutamate et GABA lors de l'anticipation des injections de morphine au 14^{ème} jour d'arrêt du traitement dans le noyau accumbens core</i>	<i>120</i>
<i>Tableau 1 : Les mécanismes permettant aux drogues une libération de dopamine dans le noyau accumbens</i>	<i>38</i>
<i>Tableau 2 : Synthèse des fournisseurs et facteurs de dilution des anticorps primaires et secondaires</i>	<i>92</i>
<i>Tableau 3 : Bilan des résultats obtenus sur la signalisation du BDNF au 14^{ème} jour de sevrage dans le noyau accumbens ...</i>	<i>105</i>
<i>Tableau 4: Bilan des résultats neurochimiques au 1^{er} et 14^{ème} jour de sevrage.....</i>	<i>121</i>
<i>Encadré 1 : Critères diagnostiques de l'addiction à une substance selon le DSM-5</i>	<i>22</i>
<i>Encadré 2 : Résumé des principales théories de l'addiction.....</i>	<i>27</i>
<i>Encadré 3 : Les épines dendritiques : définition et morphologie</i>	<i>56</i>

Principales abréviations

Utilisées dans la communauté scientifique en France, certaines abréviations citées au cours de ce manuscrit sont basées sur leur nom anglais.

AMPA : acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique	M6G : morphine-6-glucuronide
AMPC : adénosine monophosphate cyclique	MAO: monoamine-oxydase
ATV : aire tegmentale ventrale	MOR: mu-opioid receptors
BDNF : brain-derived neurotrophic factor	Nac: noyau accumbens
BHE : barrière héméto-encéphalique	NGF: nerve growth factor
COMT : catéchol-O-méthyltransférase	NMDA: n-méthyl-D-aspartate
CPFm : Cortex Pré-frontal médian	PGP: permeability-GlycoProtein
CREB : C-AMP Response Element-binding protein	PI3K: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
CRF : corticotrophin releasing factor	PLCγ: phospholipase C
DAT : dopamine transporter	RAVE: receptor activation versus endocytosis
EAATs: excitatory amino acid transporters	RBP: RNA-Binding Protein
JNK: c-Jun N-terminal kinase	SNC: système nerveux central
GABA : acide gamma-aminobutyrique	TH: tyrosine hydroxylase
GAD: glutamic acid decarboxylase	tPA : tissue plasminogen activator
GAT: GABA transporters	TrkB : tropomyosin receptor kinase B
GDP : guanosine diphosphate	TrkB.FL : full-length tyrosine kinase receptor
GTP guanosine triphosphate	TrkB.T1: truncated receptor isoform 1
KO: knock-out	UGT: UDP-glucuronyltransferase
L-DOPA : L-3,4-dihydroxyphenylalanine	UTR: untranslated transcribed region
LTD: Long-term depression	VGAT : vesicular GABA transporter
LTP: long-term potentiation	VMAT2 : vesicular monoamine transporter 2
M3G : morphine-3-glucuronide	

Avant-propos

Le premier chapitre de l'introduction donne une définition globale de ce qu'est l'addiction et présente les substrats neurobiologiques que la pathologie affecte. Au cours de ces travaux, ce sont les conséquences d'un traitement à la morphine, un opiacé, qui ont été étudiées. Le chapitre 2 rapporte les modifications neurobiologiques particulières que vont engendrer les opiacés. Enfin, la recherche de biomarqueurs dans le domaine de l'addiction est en pleine effervescence : on cherche en effet à pronostiquer la maladie afin de prévenir au mieux les phénomènes de rechutes à long terme. Parmi les biomarqueurs, le BDNF, un facteur neurotrophique, pourrait être un bon candidat. Il est en effet impliqué de façon physiologique dans l'apprentissage et la mémoire, or l'altération de ces phénomènes est proposée par certains chercheurs comme participant à l'évolution de la maladie (l'addiction peut être considérée comme le résultat d'un apprentissage aberrant). Le chapitre 3 est ainsi dédié à la présentation du BDNF, de son rôle physiologique vers les régulations du BDNF dans les différents stades de l'addiction, dont notamment le sevrage et la rechute.

Bien que l'usage des termes toxicomanie, dépendance et addiction soit débattu (Erickson and Wilcox, 2006; O'Brien et al., 2006), ils seront employés indifféremment au cours de ce manuscrit.

Introduction

« Sans imagination, il ne pourrait y avoir de création »

Albert Jacquard

CHAPITRE 1 : L'ADDICTION : DE LA DÉFINITION DE LA MALADIE VERS LA NEUROBIOLOGIE

DÉFINITION ET CRITÈRES DIAGNOSTIQUES

L'addiction est une maladie psychiatrique chronique qui engendre de lourdes conséquences dans nos sociétés modernes, à la fois en terme de santé publique et au niveau économique. À ce jour, il n'y a pas réellement de consensus sur la définition de l'addiction tant le concept est en évolution constante. Étymologiquement, le terme vient du latin *ad-dicere* qui signifie « dire à ». On disait notamment d'un esclave qu'il était *dictus ad*, c'est-à-dire « dit à » un maître. Dans le droit romain ancien, l'addiction représentait la contrainte par corps où l'esclave, ne pouvant se substituer à ses dettes, était mis à disposition de son créancier (Fernandez and Sztulman, 1997). Bien que renvoyant plutôt à un versant juridique, l'étymologie du mot amène bien la problématique de dépendance et de soumission. En 1990, le psychiatre Goodman propose une définition générale qui marquera le milieu de la psychologie et de la psychiatrie des addictions, et selon laquelle l'addiction est « un processus par lequel est réalisé un comportement ayant pour fonction de procurer du plaisir et de soulager un malaise intérieur, et qui se caractérise par l'échec répété de son contrôle et sa persistance en dépit des conséquences négatives » (Goodman, 1990).

Des caractéristiques claires distinguent bien l'usage récréatif et contrôlé de l'addiction. Ainsi, aujourd'hui, l'addiction inclut les notions de recherche compulsive de la drogue, associées à une perte de contrôle sur sa prise, favorisant l'émergence d'un désir persistant pour la drogue (autrement appelé *craving*) (voir figure 1). A l'arrêt de la consommation, des **symptômes de sevrage** peuvent émerger : un état émotionnel négatif, des troubles cognitifs et des symptômes physiques du sevrage. Les symptômes de dépendance physique résultent d'adaptations dans les circuits neuronaux qui contrôlent les fonctions vitales comme le débit cardiaque ou la pression artérielle. Des drogues tel que l'éthanol et les opiacés vont produire une dépendance physique alors que ce n'est pas le cas pour la cocaïne ou les amphétamines (Hyman and Malenka, 2001). Les épisodes de rechutes peuvent survenir au cours de cette période de sevrage aigu. Les rechutes peuvent subvenir pour contrer les effets négatifs du sevrage, par une nouvelle prise de drogue aux effets renforçants positifs.

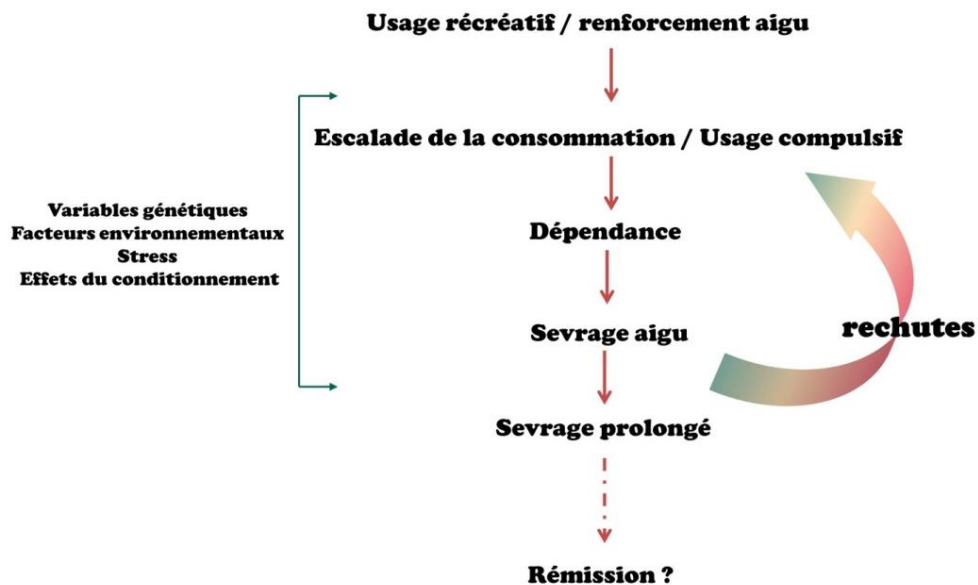


Figure 1 : Les différentes étapes dans la mise en place de l'addiction

Les premières prises de drogue se font généralement dans un contexte social et provoquent un effet de renforcement positif très fort. Bien que cela ne soit pas systématique, il arrive que l'on passe de l'usage récréatif à une escalade de la consommation et à un usage compulsif qui mènera à l'addiction. L'arrêt de la consommation constitue la période de sevrage, au cours de laquelle de nombreuses neuroadaptations vont se mettre en place. Cette période d'abstinence peut durer quelques jours, mais aussi des semaines, des mois ou des années jusqu'à une éventuelle rémission. Cependant, lors du sevrage et de l'abstinence prolongée, les rechutes peuvent apparaître, réinitiant ainsi un cycle. L'entrée dans ce cycle de dépendance et de rechute est dépendant de facteurs génétiques, environnementaux, du stress et des conditionnements liés aux prises de drogues (Koob and Moal, 2005)

Lorsque ces symptômes physiques disparaissent, des épisodes de rechute peuvent encore être observés, y compris après de longues périodes d'abstinence (Hyman and Malenka, 2001; Wolffgramm and Heyne, 1995). Les rechutes à long terme peuvent être précipitées par une réexposition au contexte dans lequel les prises de drogues s'effectuaient (O'Brien et al., 1992), ou encore par le stress (Sinha, 2011).

L'association américaine de psychiatrie n'a eu de cesse d'adapter la caractérisation clinique de l'addiction. Il s'agit d'uniformiser le diagnostic de l'addiction afin d'objectiver au mieux la maladie. La caractérisation de la maladie s'est faite dans un premier temps via des approches catégorielles (différenciant l'abus et la dépendance), pour aller vers des approches dimensionnelles (avec un continuum de degré de sévérité). Ces approches explicitent différents critères répertoriés dans le manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (DSM). La 5^{ème} et dernière édition de ce manuel (DSM-V), parue en 2013 propose ainsi 11 critères caractérisant les désordres d'usage de substances (encadré 1). L'individu présentant au moins 2 des 11 critères à un moment donné sur une période continue de 12 mois est considéré comme dépendant. Le nombre de critères présents chez un individu marque la sévérité des troubles : la réponse de 2 à 3 critères indique un trouble léger, un trouble modéré correspond à la validation de 4 à 5 symptômes tandis qu'un trouble est considéré comme sévère par la présence de 6 critères ou plus.

Addiction à une substance

Il s'agit d'un mode d'utilisation inadapté d'une substance conduisant à une altération du fonctionnement ou à une souffrance, cliniquement significative, caractérisée par la présence de deux (ou plus) des manifestations suivantes, à un moment quelconque d'une période continue de 12 mois.

1. La substance est souvent prise en quantité plus importante ou pendant une période plus prolongée que prévue
2. Il existe un désir persistant ou des efforts infructueux pour diminuer ou contrôler l'utilisation de cette substance
3. Beaucoup de temps est passé à des activités nécessaires pour obtenir la substance, utiliser la substance ou récupérer ses effets
4. Il existe un *craving* ou une envie intense de consommer la substance
5. L'utilisation répétée de la substance conduit à l'incapacité de remplir des obligations majeures, au travail, à l'école ou à la maison
6. Il existe une utilisation de la substance malgré des problèmes interpersonnels ou sociaux, persistants ou récurrents, causés ou exacerbés par les effets de la substance
7. Des activités sociales, occupationnelles ou récréatives importantes sont abandonnées ou réduites à cause de l'utilisation de la substance
8. Il existe une utilisation répétée de la substance dans des situations où cela peut être physiquement dangereux
9. L'utilisation de la substance est poursuivie bien que la personne sache avoir un problème psychologique ou physique persistant ou récurrent susceptible d'avoir été causé ou exacerbé par cette substance
10. Il existe une tolérance, définie par l'un des symptômes suivants :
 - Besoin de quantités plus fortes de la substance pour obtenir une intoxication ou l'effet désiré
 - Effet diminué en cas d'utilisation continue d'une même quantité de substance
11. Il existe un sevrage, caractérisé par l'une ou l'autre des manifestations suivantes :
 - Syndrome de sevrage caractérisé à la substance
 - La substance (ou une substance proche) est prise pour soulager ou éviter les symptômes de sevrage.

PRÉVALENCE DE L'ADDICTION

On définit la prévalence comme étant la proportion d'individu ayant une maladie à un moment donné ou pendant un laps de temps bien précis. Il est important de préciser qu'une large majorité de la population peut maintenir une consommation contrôlée de drogues et en avoir un usage récréatif, sans développer une addiction. En revanche, une certaine proportion, variable selon la drogue, va développer une consommation compulsive et perdre progressivement le contrôle sur sa consommation (Anthony et al., 1994). Par exemple en 2013, 246 millions d'individus dans le monde (soit 1 personne sur 20 parmi une population âgée de 15 à 64 ans) ont fait usage d'une drogue illicite (ONU DC, 2015). Parmi eux, 27 millions de personnes ont un usage problématique de la drogue (consommation par voie intraveineuse ou usagers réguliers d'opiacés, cocaïne ou amphétamine). Il existe en effet une vulnérabilité multifactorielle à l'addiction, qui sera explicitée dans la prochaine section. En France, l'alcool et le tabac sont les substances les plus consommées. L'observatoire français des drogues et des toxicomanies (OFDT, <http://www.ofdt.fr/>) rapporte que 29 % des adultes de 18 à 75 ans et 32 % des adolescents de 17 ans sont des fumeurs quotidiens. Pour l'alcool, l'organisme dénombre 10% de consommateurs quotidiens chez les 18-75 ans et 12 % de consommateurs réguliers chez les adolescents. Il est également rapporté que 1,5 % des 18-64 ans ont expérimenté l'héroïne au moins une fois au cours de leur vie.

LA VULNÉRABILITÉ À L'ADDICTION

A l'heure actuelle, un nombre conséquent d'études s'intéressent aux facteurs de vulnérabilité dans le développement de l'addiction. On sait aujourd'hui que le développement de l'addiction résulte de **l'interaction** entre le **produit** lui-même, **l'environnement**, et **la vulnérabilité individuelle** (Kreek et al., 2002). Bien qu'ils soient détaillés de façon séparée ci-après, il est important de comprendre que ces facteurs sont intimement associés dans la vulnérabilité à développer une dépendance. Aucun facteur isolé ne saurait à lui seul expliquer la valeur prédictive du développement d'une addiction. La **vulnérabilité liée au produit** dépend du **pouvoir toxicomanogène de la substance** (figure 2). Ainsi, la consommation de ces produits pourra engendrer un risque d'**apparition de complications** d'ordres sanitaires, psychologiques et sociales.

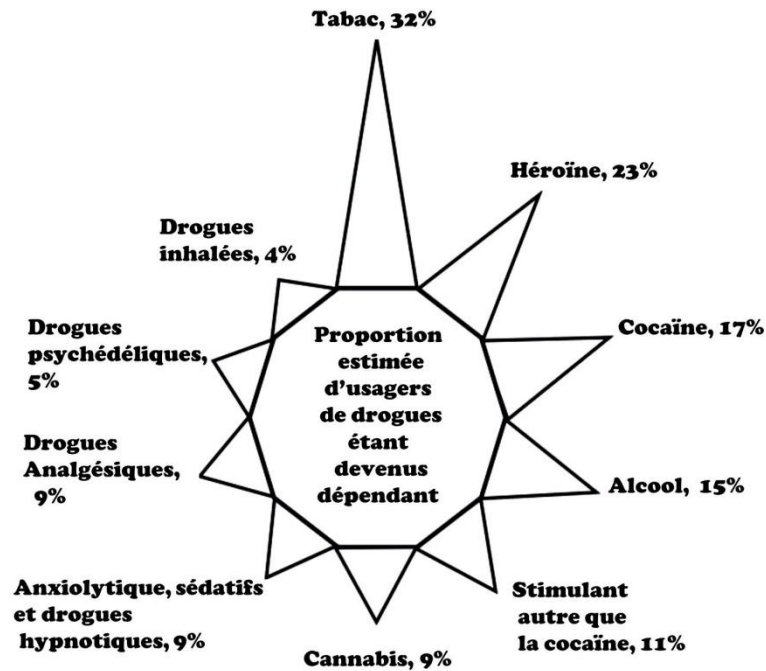


Figure 2 : Probabilité de développer une dépendance parmi les usagers de drogues

Adapté d'après Anthony and Helzer, 2002

Les substances pharmacologiques classées en tant que drogues ont des structures et des propriétés différentes, des cibles spécifiques et des effets comportementaux propres. Toutes agissent cependant comme renforçant positif et peuvent induire une addiction. Peu d'individus ayant fait l'expérience de la drogue vont avoir un usage compulsif et développer une addiction. Qu'est ce qui fait qu'un individu plutôt qu'un autre va développer une consommation compulsive ? Les propriétés pharmacologiques de la drogue elle-même vont induire une neuroplasticité qui pourra être responsable d'une tolérance, d'une sensibilisation, d'un conditionnement, d'une dépendance et de symptômes de sevrage à l'arrêt de la consommation (Piazza and Le Moal, 1996). Parmi les **risques individuels**, on peut citer l'influence de la **génétique**, les facteurs neurobiologiques qui sous-tendent différents **traits de personnalités** et l'**aspect psychologique** responsable de comorbidités. Une étude a montré qu'il y a 8 fois plus de risques de développer une addiction en ayant des membres proches (parents, frères et sœurs) dans sa famille qui sont déjà dépendants à des substances, telles que les opioïdes, la cocaïne ou encore le cannabis (Merikangas et al., 1998).

Parmi les études génétiques réalisées, plusieurs variants et haplotypes localisés au niveau du gène codant pour le récepteur opioïde μ (OPRM1) ont été associés à des phénomènes de dépendance (Kreek et al., 2002; LaForge et al., 2000). Enfin, certains variants codant pour des enzymes de dégradation de l'éthanol peuvent **protéger contre le développement** de l'alcoolisme. Par exemple, les gènes codant pour l'enzyme alcool déshydrogénase (ADH) et l'enzyme aldéhyde déshydrogénase (ALDH) ont des polymorphismes qui

modifient leurs propriétés catalytiques et vont affecter de façon significative le métabolisme de l'éthanol. Les individus possédant une enzyme très active (l'allèle ADH 2 en particulier) sont plutôt protégés d'une consommation excessive d'alcool, car l'accumulation d'acétaldéhyde dans l'organisme présente des propriétés toxiques dissuasives (Kreek et al., 2005; Li et al., 2001).

De ces données, on ne peut pas conclure pour autant qu'il existe un gène qui déterminerait le développement ou non d'une addiction chez un individu et les effets génétiques demeurent cependant faibles et indirects.

Parmi les **traits de personnalité** pouvant prédisposer au développement d'une consommation compulsive et à l'addiction on trouve **l'impulsivité**, la **recherche de sensation**, ou encore **l'anxiété** (pour revue, voir Sarraon et al., 1999; Crews and Boettiger, 2009; Belin et al., 2016). La théorie de l'automédication de Khantzian propose que la personnalité d'un individu (et ses failles comme une faible auto-estime) va l'orienter vers une drogue en particulier. Par exemple certains individus ayant des comportements violents trouvent dans la consommation d'opiacés un moyen de se sentir « normal, calme, apaisé et relaxé » (Khantzian, 1997). Il s'agit là de soulager une souffrance ou un malaise. La maltraitance pendant l'enfance a également été rapportée comme étant un facteur pouvant prédisposer à l'addiction (De Bellis, 2002). Le stress post-traumatique provoqué par un tel événement peut aussi amener l'individu à rechercher un certain apaisement dans la consommation.

Le fait de posséder ces différents traits ne présage pas forcément le développement de l'addiction. Le stress est également un facteur facilitant l'initiation de la prise de drogue et l'escalade de la consommation chez les adolescents et jeunes adultes (Sinha, 2008). La dépression (Arango-Lievano and Kaplitt, 2015) fait partie des **facteurs individuels** qui pourrait faciliter le passage vers l'addiction. Il y a en effet une forte comorbidité entre la dépression et l'addiction puisque la prévalence de la dépression chez les individus dépendant est de 30 % (Arango-Lievano and Kaplitt, 2015; Quello et al., 2005; Thoma and Daum, 2013).

Enfin, l'influence de **l'environnement** va se faire à plusieurs niveaux. Les facteurs sociodémographiques et socioculturels mais aussi l'éducation, les rapports familiaux peuvent influencer la vulnérabilité (Swendsen and Le Moal, 2011). Il y a par exemple différentes prévalences à la dépendance de drogues selon les pays, qui peuvent être expliquées par la disponibilité des drogues et les politiques de prévention et de répression propres aux pays. L'ensemble de ces facteurs, dits épigénétiques, peuvent entraîner un usage problématique de la drogue et une dépendance et font l'objet de nombreuses études aujourd'hui.

La présence de polluants dans l'environnement en tant que facteur de vulnérabilité pose actuellement question. Ces derniers peuvent en effet altérer la fonction du transporteur de la dopamine (DAT), ou encore les taux extracellulaires de dopamine et de glutamate, ce qui prédispose à certaines maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson et Alzheimer (Sussman et al., 2015). Le

développement de l'addiction étant le siège de remaniement neurochimique, il n'est pas impossible que les polluants jouent aussi un rôle dans la vulnérabilité à développer une addiction (Allen et al., 2013; Sussman et al., 2015).

Comme précédemment évoqué, **tous les individus exposés à une même quantité de produit ne vont pas forcément développer une addiction**. L'étude de l'addiction chez l'homme possède, ne serait-ce que d'un point de vue éthique, un certain nombre de limites. La présence de facteurs confondants, les poly-consommations, la sélection de cohortes peu représentatives de la population générale limitent l'interprétation des résultats des études cliniques. La modélisation de l'addiction chez l'animal, bien qu'imparfaite à l'heure actuelle, permet l'obtention de résultats dont les conditions expérimentales sont finement contrôlées. Grâce à ces modèles, des endophénotypes prédictifs d'une prise compulsive de drogues et de la transition vers l'addiction ont été identifiés chez le rongeur (Belin et al., 2016), de même que des facteurs protecteurs, comme un environnement enrichi (Solinas et al., 2008). Par exemple il a été montré que l'anxiété chez des rats, mesurée par le test du labyrinthe en croix surélevé, était un critère de vulnérabilité dans l'escalade de la prise de cocaïne. En revanche, avec l'héroïne, les scores d'anxiété ont été décorrélés des scores d'escalade de la consommation (Dilleen et al., 2012).

LE CIRCUIT DE LA RÉCOMPENSE ET LES SUBSTRATS BIOLOGIQUES DE L'ADDICTION

Différentes **théories de l'addiction**, résumées succinctement dans l'encadré 2, tentent d'expliquer et définissent l'addiction selon différentes approches en fonction des données scientifiques que l'on possède. Ces théories mettent en lumière **des substrats neurobiologiques communs** altérés par toutes les drogues. Bien qu'elles partagent des mécanismes communs (Nestler, 2005), **les processus psychologiques et neurobiologiques** qui sous-tendent l'addiction sont cependant **différents selon les drogues** (Badiani et al., 2011; Kreek et al., 2005; Nestler, 2005).

Les théories de l'addiction

Différentes théories ont été développées pour comprendre pourquoi une personne va consommer de la drogue, et comment se fait la progression de l'usage récréatif vers une consommation compulsive. Bien que non exhaustives, les principales théories présentées ci-dessous ont fortement orienté les recherches dans le domaine de l'addiction.

Théorie psychomotrice de l'addiction

Cette théorie naît de la théorie du renforcement positif, dans laquelle toutes les drogues activent le système dopaminergique mésocorticolimbique. Selon cette théorie, les drogues, qui ont des propriétés renforçantes et un potentiel addictogène induisent une activation psychomotrice due à l'activation du système dopaminergique (Wise and Bozarth, 1987).

Sensibilisation de la motivation

Cette théorie se base sur le fait que les drogues augmentent la transmission dopaminergique au sein du circuit mésocorticolimbique. L'activation de ce dernier est favorisée par le contexte et les indices associés à la prise de drogue. Au fur et à mesure des prises, ces indices vont prendre une valence motivationnelle extrêmement importante. La prise répétée de drogue induirait des modifications neurobiologiques telles que le système serait hypersensible aux drogues et aux stimuli contextuels qui lui sont associés (Robinson and Berridge, 1993, 2000).

Hédonie allostasique

Cette théorie se base initialement sur la théorie motivationnelle des processus opposants. Si l'usage initial de drogue est contrôlé par ses effets récompensants, l'usage chronique amène lui à une diminution des effets positifs et au recrutement d'un système lié au stress. Ceci se traduit par un nouvel « état » que l'on appelle l'état d'allostasie hédonique, qui représente un abaissement dans le seuil normal de récompense (Koob and Le Moal, 1997; Solomon and Corbit, 1974)

Apprentissage abberant

Avec le temps, les stimuli environnementaux associés aux prises de drogue suffisent eux même à provoquer un désir très fort pour la drogue.

Si au départ la prise de drogue est contrôlée par un mécanisme dépendant des conséquences de la prise (action – conséquence, mémoire exacerbée des effets hédoniques de la drogue), il se produit une transition vers un comportement automatique où c'est le stimulus qui engendre la réponse. A terme, ceci est responsable de la compulsion (Berke and Hyman, 2000; Everitt et al., 2001; O'Brien et al., 1992)

Encadré 2 : Résumé des principales théories de l'addiction

Les neurotransmetteurs impliqués dans le système de récompense

Au cours de ces travaux de thèse, nous nous sommes concentrés sur l'analyse de 3 neurotransmetteurs : la dopamine, le glutamate et le GABA.

Le glutamate et l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) sont les neurotransmetteurs les plus communs dans le système nerveux central (SNC) et sont respectivement excitateur et inhibiteur. Au niveau physiologique, le glutamate est le neurotransmetteur clé indispensable aux phénomènes de mémoire et d'apprentissage, or les phénomènes d'anticipation requièrent des processus mnésiques renforcés (Adcock et al., 2006; Antle and Silver, 2009). Dans la mesure où ils appartiennent à la même voie métabolique, une balance entre le GABA et le glutamate est nécessaire aux fonctions physiologiques du (SNC) (Petroff, 2002). Des perturbations dans le ratio de ces neurotransmetteurs sont décrites lors de la dépression (Sanacora et al., 2004) ou lors de stress post-traumatiques (Rossi et al., 2009). D'autre part, il a été montré chez l'homme et chez l'animal une perturbation de la balance GABA/glutamate lors du sevrage aigu à l'alcool. Une diminution de la concentration du GABA et une augmentation de la concentration de glutamate ont été relevées dans le plasma chez des patients admis aux urgences pour une intoxication aiguë à l'alcool (Brousse et al., 2012). Des perturbations dans les balances de GABA et de glutamate lors du sevrage pourraient donc être généralisées à d'autres drogues. Il a d'ailleurs été montré une augmentation du taux extracellulaire de GABA au niveau central après 3 semaines d'arrêt d'un traitement à la cocaïne chez le rat (Xi et al., 2003). Avec la morphine, la drogue utilisée au cours de ces travaux, une forte altération de la signalisation glutamatergique dans plusieurs régions cérébrales au cours du sevrage a été reportée (Peters and De Vries, 2012; Xu et al., 2003). Ces altérations seront détaillées dans le chapitre suivant.

Enfin, les phénomènes d'anticipation, décrits dans la dernière partie de ce chapitre, sont relayés au niveau neurochimique par des modifications de la décharge des neurones dopaminergiques dans le circuit de la récompense (Schultz, 2006).

LA DOPAMINE

La dopamine, au même titre que la norépinephrine et l'épinephrine, fait partie des catécholamines qui jouent un rôle central dans la régulation des processus physiologiques tels que la locomotion, la cognition, les renforcements positifs ou encore la prise alimentaire. Quatre voies dopaminergiques ont été identifiées dans le cerveau de mammifères : il s'agit des systèmes nigrostrié, mésolimbique, mésocortical et tubéroinfundibulaire (Andén et al., 1964; Beckstead et al., 1979; Björklund and Dunnett, 2007; Fallon and Moore, 1978; Lindvall et al., 1978).

La voie mésocorticolimbique, qui regroupe le système mésolimbique et mésocortical, sera détaillée dans la prochaine section car elle intervient spécifiquement dans le processus de récompense.

Si la dopamine est un neurotransmetteur important au niveau central, elle est également produite par les organes mésentériques. En effet, près de la moitié de la dopamine est synthétisée dans le tractus gastro-intestinal (Eisenhofer et al., 1997). Au niveau périphérique, la dopamine participe à la régulation hormonale ainsi qu'aux fonctions cardiovasculaires. Dans le système nerveux central (SNC), la biosynthèse de la dopamine (figure 3) se fait en deux étapes dans le cytosol des neurones catécholaminergiques : l'acide aminé précurseur, la L-tyrosine, est hydroxylée par l'enzyme tyrosine hydroxylase (TH) pour produire la dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) (Meiser et al., 2013). La L-DOPA est ensuite décarboxylée en dopamine par la DOPA décarboxylase (AADC).

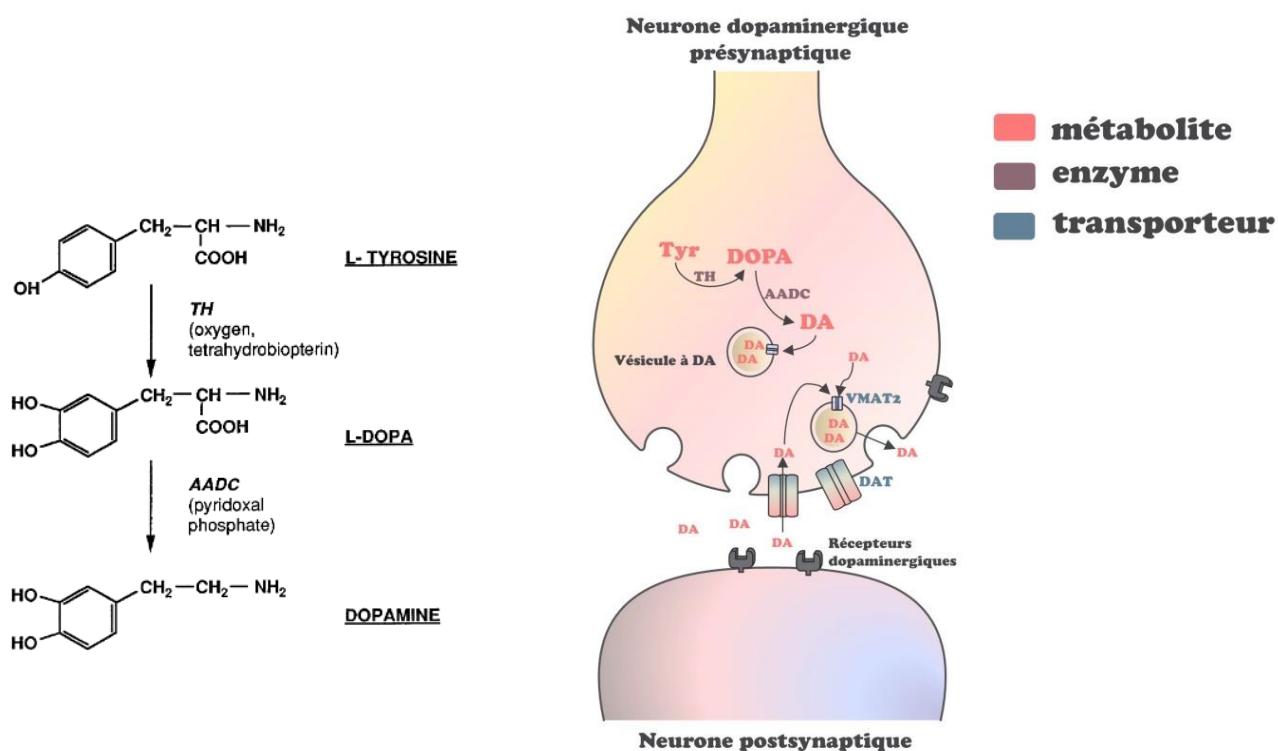


Figure 3 : Biosynthèse (gauche) et métabolisme (droite) de la dopamine au niveau neuronal

DA : dopamine, Tyr : tyrosine, TH : tyrosine hydroxylase, L-DOPA : L-3,4 dihydroxyphénylalanine, VMAT2 : Vesicular Monoamine Transporter 2, DAT : dopamine transporter, adapté d'après Meiser et al, 2013 et Elsworth et Roth, 1997

La dopamine produite est ensuite stockée au niveau des terminaisons axonales dans des vésicules synaptiques par le transporteur vésiculaire de monoamine VMAT2. Lors d'un influx nerveux sur le neurone dopaminergique, les vésicules vont fusionner avec la membrane plasmique et permettre la libération de la

dopamine dans la fente synaptique. La dopamine pourra alors interagir avec des récepteurs post-synaptiques ou des autorécepteurs pré-synaptiques. La quantité de dopamine extracellulaire libérée va être liée au profil de décharges neuronales (Diana and Tepper, 2002) (Diana and Tepper 2002) (M. Diana & Tepper, 2002) (Diana and Tepper, 2002) (51). Par exemple, lorsque les neurones dopaminergiques déchargent « en bouffées » (série de potentiels d'action rapides intervenant dans un intervalle de temps réduit : 3 à 10 potentiels d'actions dans un intervalle compris entre 40 et 80 ms), la quantité de dopamine extracellulaire quantifiée est plus importante que lors de décharges toniques plus régulières. Lors d'une menace par exemple, cette activité de décharge des neurones dopaminergiques maintient l'organisme en éveil pour s'adapter au stimulus (Diana and Tepper, 2002; Gonon, 1988; Grace, 2016).

Les récepteurs post-synaptiques de la dopamine sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à des protéines G. Selon la protéine G couplée aux récepteurs, ils ont été classés en 2 groupes : les récepteurs de type 1 (D1-like), comprenant les récepteurs D1 et D5, et les récepteurs de type 2 (D2-like), parmi lesquels on trouve les récepteurs D2, D3 et D4 (Beaulieu and Gainetdinov, 2011). Les récepteurs de type 1 sont couplés à une protéine G_{α_s} , qui va stimuler la production d'AMPC (cyclic adenosine monophosphate) via l'adénylate cyclase. Les récepteurs de type 1 ne sont retrouvés qu'au niveau post-synaptique, contrairement aux récepteurs de type 2 que l'on peut retrouver également au niveau pré-synaptique, où ils y ont la fonction d'autorécepteurs. Les récepteurs de type 2 sont couplés à la protéine G_{α_i} , qui induit une inhibition de l'adénylate cyclase (Kebabian and Calne, 1979; Missale et al., 1998; Vallone et al., 2000). La stimulation des autorécepteurs au niveau somato-dendritiques diminue le taux de décharges des neurones dopaminergiques alors que leur stimulation dans la partie terminale inhibe la synthèse et/ou la libération de dopamine (Elsworth and Roth, 1997).

L'élimination de la dopamine dans la fente synaptique marque l'arrêt du signal. Celui-ci peut se faire par recyclage de la dopamine par recapture (80 % de la dopamine libérée) via le transporteur de la dopamine DAT dans le neurone pré-synaptique (Eriksen et al., 2010). Enfin, la dopamine peut être métabolisée par 2 enzymes : via la monoamine oxydase (MAO) ou par la catéchol-O-méthyltransférase (COMT) (Meiser et al., 2013).

LE GLUTAMATE

On considère le L-glutamate comme **l'acide aminé majeur relayant des signaux excitateurs** dans le SNC des mammifères (Erecińska and Silver, 1990). Il est impliqué dans bons nombres de **fonctions physiologiques** telles que les apprentissages, la mémoire ou encore la cognition. La transmission glutamatergique doit être finement contrôlée, toutes variations en dehors d'une certaine limite physiologique peuvent entraîner des effets néfastes. En effet une concentration extracellulaire excessive de glutamate conduit, via une

dépolarisation neuronale continue, à un processus toxique appelé excito-toxicité (Kalivas, 2009). Tout comme la dopamine, le glutamate a également un rôle dans les organes et tissus périphériques qui ne sera pas abordé ici mais est décrit largement dans la littérature (Carlton, 2001; Du et al., 2016; Hinoi et al., 2004; Nedergaard et al., 2002).

La majorité du glutamate présent dans le cerveau résulte d'une **synthèse de novo par les astrocytes** via le cycle de Krebs. En effet, la barrière hémato-encéphalique (BHE) prévient le passage du glutamate de la périphérie vers le cerveau afin d'éviter les **phénomènes d'excito-toxicité** (Hawkins, 2009; Hertz et al., 1999). Pour maintenir une transmission glutamatergique, les neurones glutamatergiques sont en effet **dépendants des astrocytes**, qui contiennent les enzymes nécessaires à la synthèse du précurseur neuronal du glutamate : la glutamine (un acide aminé non neuroactif), à partir du glucose (Hamberger et al., 1979; Schousboe et al., 2014). On parle de **synapse glutamatergique tripartite** (neurones pré- et post-synaptiques et les astrocytes) (Parpura et al., 1994) (figure 4).

Dans les neurones, le glutamate est **stocké dans des vésicules synaptiques** via les transporteurs vésiculaires de glutamate vGluTs. Lors **d'un influx nerveux**, les vésicules fusionnent avec la membrane plasmique, et le **glutamate est libéré par exocytose**, par un mécanisme dépendant du calcium (Parpura and Verkhratsky, 2012). La libération du glutamate ne se fait pas qu'au niveau du neurone pré-synaptique : les astrocytes en libèrent aussi, soit par un mécanisme dépendant du calcium (Parpura et al., 1994), soit pas un antiport anionique qui permet l'échange d'une L-cystéine extracellulaire contre un L-glutamate intracellulaire à travers la membrane plasmique (Bridges et al., 2012).

Dans la fente synaptique, le glutamate peut activer une famille de **récepteurs canaux ioniques**, dont les noms reflètent les ligands exogènes sélectifs de chaque sous-type, comprenant le N-méthyl-D-aspartate (NMDA), l' α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazole-4-propionate (AMPA), et le kaïnate (Traynelis et al., 2010). Les récepteurs AMPA comprennent 4 sous-unités (GluR1-4) qui vont s'associer selon différentes combinaisons en tétramères. Les sous-unités diffèrent majoritairement à cause de modifications post-traductionnelles, ce qui leur confère des propriétés uniques. Par exemple, la sous-unité GluR2 des récepteurs AMPA est imperméable au calcium (Burnashev et al., 1992; Isaac et al., 2007).

Si la plupart des récepteurs AMPA contiennent la sous-unité GluR2, l'activité synaptique peut modifier la stœchiométrie de la composition des récepteurs AMPA et de ce fait permettre un influx calcique dans les cellules (Clem and Barth, 2006)

(Burnashev et al., 1992; Isaac et al., 2007) Les récepteurs NMDA sont des hétéro-tétramères composés de 2 sous-unités NR1 et 2 sous-unités de la famille NR2 ou NR3. Les sous-unités NR1 sont ubiquitaires dans le cerveau alors que les autres sous-unités sont plus spécifiques. Dans les neurones épineux moyens du striatum, il y a prédominance des sous-unités NR2B (Monyer et al., 1992).

Les récepteurs kaïnate et AMPA sont impliqués dans la transmission synaptique rapide : la liaison du glutamate provoque un changement conformationnel permettant l'entrée de sodium dans le neurone post-synaptique. Les récepteurs NMDA sont quant à eux uniques dans le sens où, pour être activés, ils requièrent à la fois la liaison du glutamate, mais également la dépolarisation membranaire (via l'activation des récepteurs AMPAs) afin de libérer l'ion magnésium bloquant le canal. En plus du glutamate, les récepteurs NMDA requièrent la liaison d'un co-agoniste, la glycine, pour être actifs. Elle se lie à l'extrémité N-terminale des sous-unités NR1. Une fois les récepteurs activés, le calcium et le sodium entrent dans la cellule et vont permettre la formation des courants post-synaptiques excitateurs (Rudy et al., 2015). En outre, l'influx calcique est nécessaire pour la potentialisation à long terme dépendante des récepteurs NMDA. L'activation des récepteurs NMDA va ainsi avoir des effets à long terme et permettre la stabilisation et la réorganisation des synapses.

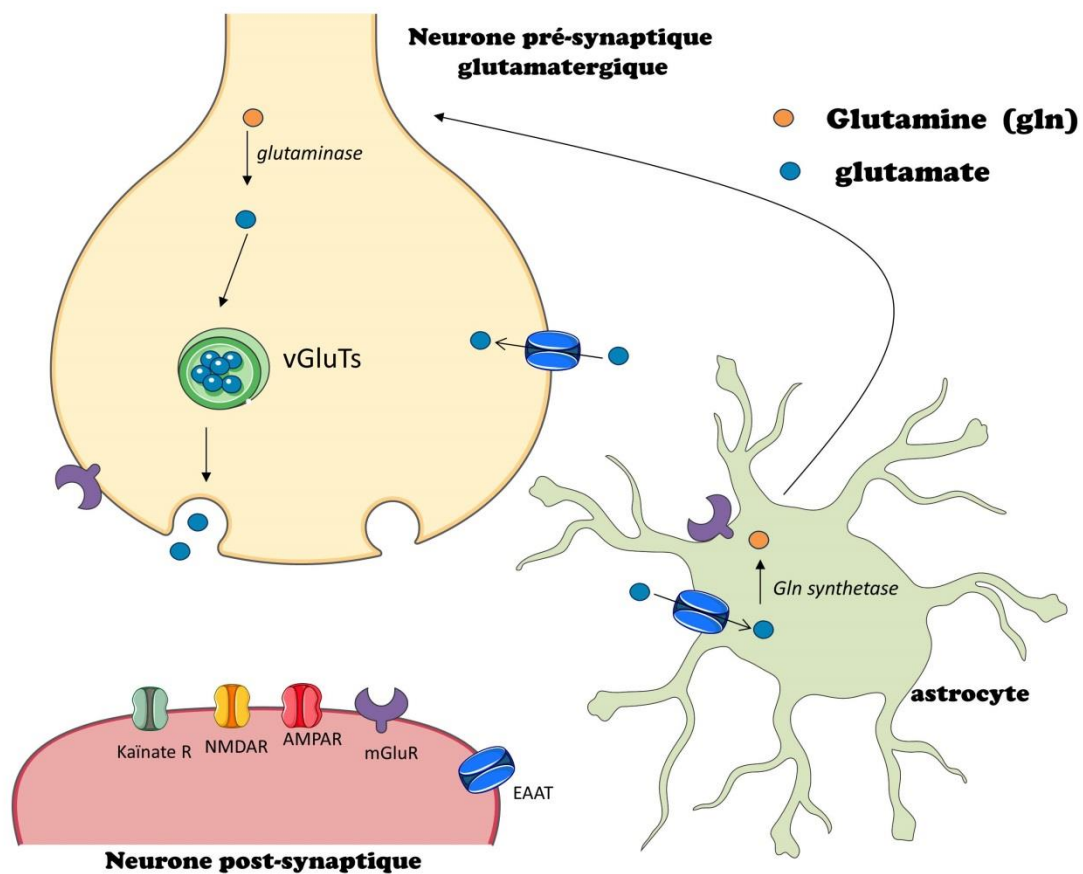


Figure 4 : Représentation simplifiée d'une synapse glutamatergique tripartite

Le neurone pré-synaptique contient les vésicules constituant des réserves de glutamate, par l'intermédiaire des transporteurs vGluTs. Dans l'espace synaptique, le glutamate peut activer des récepteurs ionotropiques ou métabotropiques. Via les transporteurs EAATs présents sur toutes les membranes, le glutamate peut être recapté au niveau intracellulaire. C'est dans les astrocytes que le processus de recapture est le plus important. Le glutamate y est transformé en glutamine, qui sera redistribuée dans le neurone pré-synaptique afin d'être recyclé en glutamate.

Le glutamate active aussi des récepteurs couplés aux protéines G : **des récepteurs métabotropiques** (Pin and Duvoisin, 1995). Ces récepteurs peuvent être situés sur les membranes pré- et post-synaptiques neuronales et sur les astrocytes. Les oligodendrocytes expriment également ces récepteurs. Compte tenu du fait qu'il n'y a pas d'enzyme de dégradation dans la fente synaptique, une régulation fine du glutamate a été mise en place. Ainsi, différents transporteurs vont recapter le glutamate au niveau intracellulaire. Cinq transporteurs d'acides aminés excitateurs différents (appelés EAATs) ont été identifiés et sont à la fois exprimés dans le neurone (EAAT3, EAAT4, EAAT5) et dans les astrocytes (EAAT1, EAAT2) (O'Shea, 2002; Shigeri et al., 2004). Dans les astrocytes, le **glutamate** pourra être **transformé en glutamine** par la glutamine synthétase. La glutamine pourra être **recaptée ensuite par le neurone**, qui **synthétisera le glutamate via l'enzyme glutaminase** par hydrolyse (Nedergaard et al., 2002; Rowley et al., 2012). Il a été montré *in vivo* qu'environ 80 % du glutamate était converti en glutamine puis réutilisé, tandis que les 20 % restants étaient dégradés par oxydation (Rothman et al., 2011). Ce système permet d'éviter l'accumulation de glutamate dans la fente synaptique afin de prévenir les phénomènes d'excitotoxicité.

LE GABA

Le GABA est le **principal neurotransmetteur inhibiteur** dans le cerveau (l'autre étant la glycine). Le GABA est synthétisé par la décarboxylation du glutamate (Roberts and Frankel, 1950), une réaction catalysée par l'enzyme cytosolique acide glutamique décarboxylase (GAD), qui existe sous deux isoformes de poids moléculaires différents et sont nommés GAD65 et GAD67 (Esclapez et al., 1994). Comme explicité ci-dessus, le glutamate neuronal peut provenir (1) directement de la recapture du glutamate extracellulaire ou (2) de la glutamine venant des astrocytes, qui peut être transformée en glutamate par la glutaminase dans la matrice mitochondriale du neurone. Dans le neurone, le GABA peut être synthétisé via le glutamate car les transporteurs glutamatergiques sont exprimés sur les neurones GABAergiques (Mathews and Diamond, 2003; Sepkuty et al., 2002). Deux voies de synthèse sont possibles : la GAD étant cytosolique, le GABA peut y être directement synthétisé à partir du glutamate cytosolique, ou bien, la synthèse peut impliquer le cycle de Krebs, dans la mitochondrie, former l' α -ketoglutarate, puis le glutamate via l'aspartate aminotransférase (Schousboe et al., 2013). Le GABA est ensuite stocké dans des vésicules via le transporteur vésiculaire d'acide aminé inhibiteur nommé vGAT (figure 5).

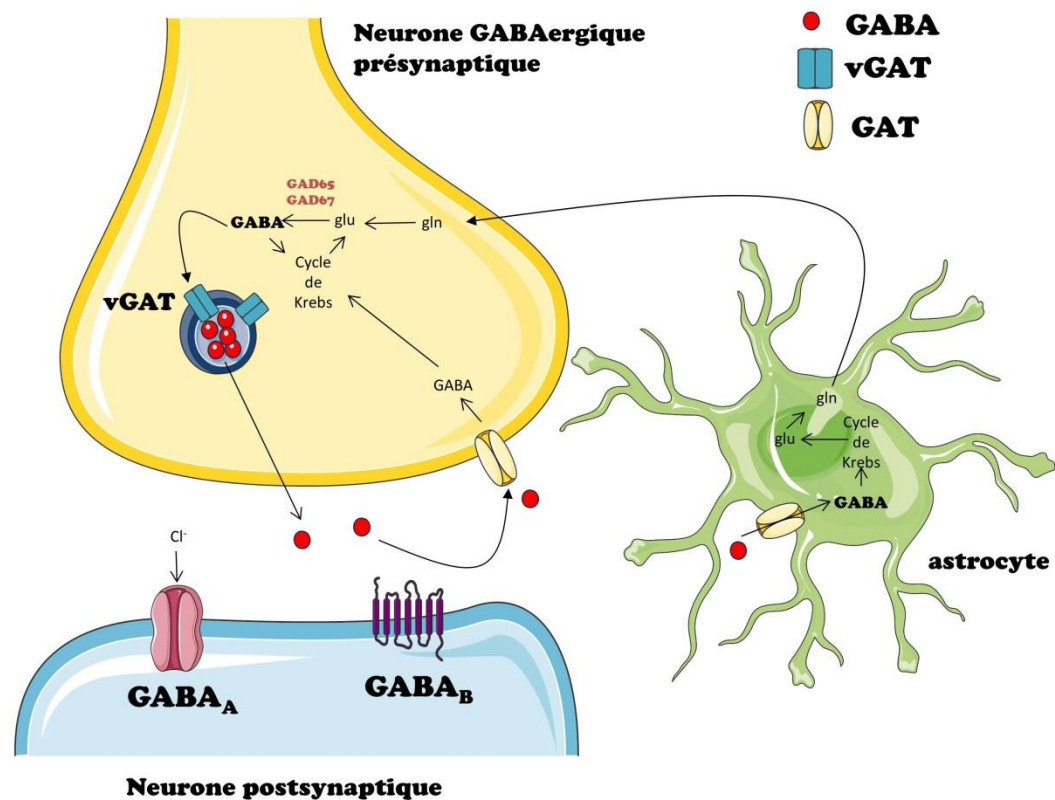


Figure 5 : Représentation simplifiée de la synthèse et du métabolisme du GABA

vGAT : transporteur vésiculaire du GABA ; GAT : transporteur membranaire du GABA, GAD : acide glutamique décarboxylase, gln : glutamine, glu : glutamate, adapté et modifié d'après Hertz, 2013; Petroff et al., 2002; Rowley et al., 2012.

Une fois libéré dans l'espace synaptique par exocytose, le GABA se lie à plusieurs types de récepteurs différents. Les récepteurs $GABA_A$ sont des canaux ioniques perméables aux ions chlore. L'entrée d'ions chlore résulte en l'inhibition du neurone et diminue la probabilité d'apparition d'un potentiel d'action. Au contraire, les récepteurs $GABA_B$ sont des récepteurs métabotropiques, couplés aux protéines G et réagissent à la liaison du GABA en se dimérisant et en activant des cascades de signalisation. Il existe aussi des récepteurs $GABA_C$, très exprimés dans la rétine. Ce sont des récepteurs canaux perméables au chlore, comme les récepteurs $GABA_A$. En mesurant l'affinité de liaison du GABA pour ses récepteurs, il a été montré que le GABA était environ 7 fois plus affiné pour le récepteur $GABA_C$ (EC_{50} : 4,2 μM) que pour le récepteur $GABA_A$ (EC_{50} : 27,1 μM) (Feigenspan and Bormann, 1994).

Contrairement au glutamate, la recapture de GABA est la plus efficace dans les neurones : seul 10 à 20% du GABA libéré dans la synapse sera recapté par les astrocytes, le reste est recapté par les terminaisons neuronales pré-synaptiques (Schousboe, 2000). La recapture du GABA s'effectue par 4 transporteurs, nommés GAT. GAT-1 est rapporté comme étant le transporteur neuronal prédominant alors que les autres sont plus ubiquitaires.

Dans les astrocytes, le GABA est catabolisé de façon séquentielle en succinate par les enzymes mitochondriales GABA transaminase et la deshydrogénase succinate semialdehyde. Ces enzymes sont à la fois exprimées par les neurones et les astrocytes. On estime que 90% du GABA dans le SNC des mammifères est dégradé de cette manière (Roth et al., 2012).

Si les 3 neurotransmetteurs précédemment décrits sont indéniablement importants dans les phénomènes physiopathologiques, il n'en demeure pas moins que d'autres, tels que l'acétylcholine, la noradrénaline (Weinshenker and Schroeder, 2006) ou encore la sérotonine (Müller and Homberg, 2015) jouent des rôles clés dans la mise en place de l'addiction.

Anatomie du circuit de la récompense

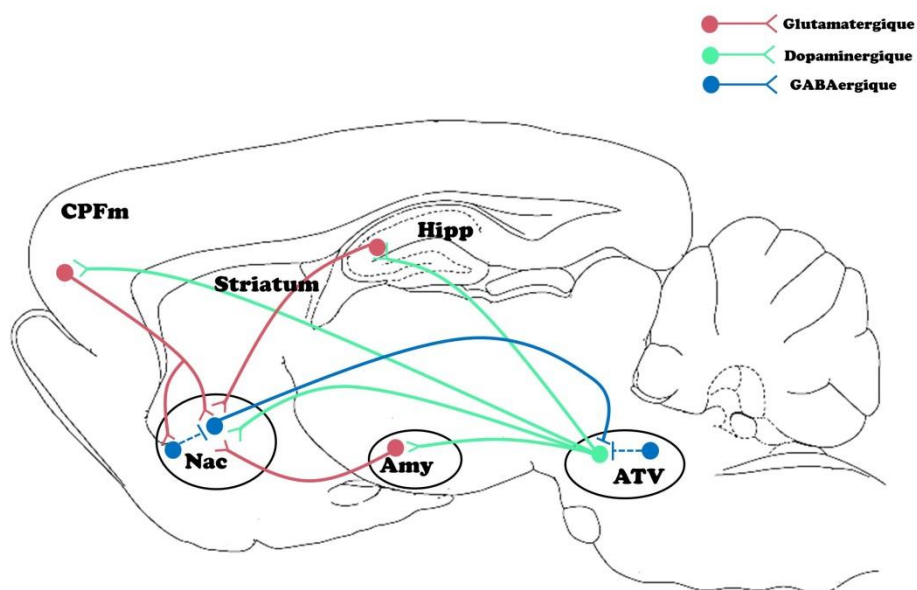


Figure 6 : Schéma du circuit de la récompense sur une coupe sagittale de cerveau de rongeur

ATV : Aire Tegmentale Ventrale ; AMY : Amygdale ; Nac : Noyau accumbens ; CPFm : Cortex Pré-Frontal médian, Hipp : Hippocampe

Des premières expériences d'autostimulation intracrâniale mises en place par Olds et Milner au début des années 50 (Olds and Milner, 1954) aux techniques optogénétiques actuelles (Witten et al., 2011), la recherche d'aires cérébrales participant aux processus de récompense et de motivation a mis en évidence des **réseaux de neurones interconnectés** activés, entre autres, par les récompenses naturelles (la nourriture, l'eau, le sexe) (figure 6) (Ikemoto and Wise, 2004; Joffe et al., 2014). Ce réseau est constitué du **système mésocorticolimbique**.

Au sein du système, la dopamine est produite dans l'aire tegmentale ventrale (ATV). Outre les 60% de neurones dopaminergiques présents, cette aire comprend également des **interneurones GABAergiques** (environ 25 %), dont l'activité inhibitrice **régule la fonction des neurones dopaminergiques**. Il existe aussi

des neurones glutamatergiques (15 %) dans l'ATV (Nair-Roberts et al., 2008). Les neurones de l'ATV vont envoyer des **projections** dans différentes aires, dont le noyau du lit de la strie terminale, l'amygdale, le pallidum ventral, le cortex préfrontal et le **striatum** (Kalivas and Volkow, 2005). Ce dernier peut être décomposé anatomiquement en une partie dorsale, et une partie ventrale : le **noyau accumbens** (Nac). On parle souvent du noyau accumbens comme d'une interface qui permet aux signaux motivationnels et émotionnels d'être traduits en une réponse adaptative comportementale. La plupart des **drogues** vont **augmenter de façon non physiologique la concentration extracellulaire de dopamine dans le Nac** (Di Chiara and Imperato, 1988; Wise and Gardner, 2002) de façon directe ou non, via différentes cibles moléculaires qui sont résumées dans le tableau 1 et la figure 6. Histologiquement, et au regard de ses différentes afférences et efférences, le Nac est lui-même subdivisé en 2 régions, le **core** et le **shell**, chacune recevant des afférences dopaminergiques de l'ATV. Si le Nac shell envoie des projections GABAergiques vers le pallidum ventral médian, l'ATV et l'hypothalamus, le Nac core envoie lui vers le pallidum ventral latéral, la partie médiale de la substance noire pars réticulée et vers le noyau sous-thalamique (Ambroggi et al., 2011).

Quatre-vingt-quinze pour cent des neurones du Nac sont **des neurones épineux de taille moyenne GABAergiques**. Le reste du Nac est composé d'interneurones GABAergiques ou cholinergiques. La fonction des neurones épineux moyens va dépendre non seulement des afférences et des efférences reçues, mais également du phénotype des neurones en eux-mêmes. En effet, les neurones épineux moyens du Nac peuvent être subdivisés en neurones porteurs des récepteurs dopaminergiques de la famille D1 (on parle des récepteurs « D1 like » et cela inclut les récepteurs dopaminergiques D1 et D5) ou en neurones porteurs des récepteurs dopaminergiques de la famille des récepteurs D2 (incluant les récepteurs D2, D3 et D4) (Surmeier et al., 2011). Il a été montré que la stimulation des neurones porteurs de récepteurs D1 dans le Nac stimule la production d'AMPC et excite les neurones qui projettent directement dans l'ATV et le pallidum ventral (la voie directe). En revanche, l'activation de la protéine Gi couplée au récepteur de la famille D2 inhibe la production d'AMPC, ce qui tend à inhiber les neurones projetant sélectivement vers le pallidum ventral (voie indirecte) (Lu et al., 1998; Surmeier, 2007).

Le Nac reçoit des **afférences excitatrices glutamatergiques** en provenance du **cortex pré-frontal** (CPF). Ce dernier est impliqué dans des fonctions exécutives et dans les processus cognitifs de flexibilité. Parmi les structures limbiques également impliquées dans la récompense, l'**hippocampe** a un rôle primordial dans les phénomènes de **mémoire et d'apprentissage** et envoie des **projections glutamatergiques vers le Nac** (Friedman et al., 2002). Une stimulation directe des axones de l'hippocampe ventral dans le Nac par optogénétique augmente l'activité locomotrice induite par la cocaïne tandis qu'une inhibition de ces fibres l'atténue (Britt et al., 2012).

Enfin, l'**amygdale basolatérale** intègre des informations positives et négatives provenant des **stimuli** environnementaux en leur attribuant une **valeur émotionnelle** (Phelps and LeDoux, 2005).

Drogues	Cible(s)	Mécanismes augmentant la libération de dopamine
Psychostimulants (<i>cocaïne, amphétamine, méthamphétamine</i>)	DAT	Agissent au niveau des transporteurs de recapture des monoamines. La cible majeure est le transporteur de la dopamine (DAT). Cocaïne : Bloque le DAT pré-synaptique, au niveau des fibres terminales monoaminergiques de l'aire tegmentale ventrale projetant vers le Nac. Méthamphétamine, amphétamine : libération de dopamine à partir des vésicules des terminaisons dopaminergiques.
Opioides (<i>héroïne, morphine</i>)	MOR	Désinhibition des neurones dopaminergiques de l'ATV par inhibition des interneurons GABAergiques contenant les récepteurs opioïdes μ dans l'ATV
Nicotine	Récepteurs nicotiques	Activation directe des neurones dopaminergiques de l'ATV par stimulation des récepteurs nicotiques, et indirectement en stimulant les récepteurs nicotiques des fibres glutamatergiques terminales projetant vers les neurones dopaminergiques de l'ATV
Alcool	Cibles multiples dont récepteurs GABA _A et NMDA	Facilite la transmission GABAergique : désinhibition des neurones dopaminergiques de l'ATV via les interneurons GABA ou inhibition des fibres glutamatergiques qui régulent la libération de dopamine dans le NAC
Cannabinoïdes	CB1	Régule la signalisation dopaminergique via les récepteurs CB1 dans les neurones du Nac et dans les fibres glutamatergiques et GABAergiques projetant vers le Nac

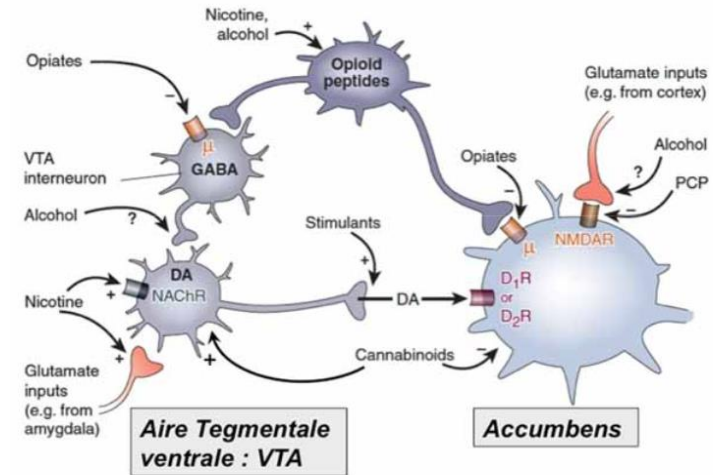


Figure 7 : Les cibles d'action de différentes drogues

D'après Nestler et al, 2005

Tableau 1 : Les mécanismes permettant aux drogues une libération de dopamine dans le noyau accumbens

Adapté d'après Volkow et al., 2011.

Bien que **nécessaire** dans les phénomènes de **motivation et de récompense**, il semble que **la dopamine** ne soit **pas suffisante** à elle seule pour expliquer l'ensemble des processus renforçants. Son **rôle** clé est en effet **nuancé**. Des études montrent que des animaux dont l'enzyme tyrosine hydroxylase (permettant la biosynthèse de la dopamine) a été inactivée présentent toujours des préférences hédoniques (préférence pour le sucrose et la saccharine) (Cannon and Palmiter, 2003) ou encore développent une préférence de place conditionnée à la morphine (Hnasko et al., 2005).

Les processus neurobiologiques qui sous-tendent l'addiction sont donc complexes et multifactoriels. Les drogues vont induire des neuroadaptations à long terme, au niveau structural, cellulaire, moléculaire et génomique (Hyman and Malenka, 2001). Une fois ces altérations neurobiologiques mises en place, des épisodes de rechutes peuvent survenir. En général, la rechute est facilitée par un contexte particulier : en présence de personnes qui consomment la drogue, ou en étant dans un environnement qui aura marqué la disponibilité de la drogue. Dans ce contexte, l'anticipation de la disponibilité immédiate de la drogue va avoir un **effet motivationnel et émotionnel** important chez les toxicomanes.

SOUVENIRS ET ANTICIPATION DES RÉCOMPENSES

Au niveau comportemental chez l'animal, des vocalisations (50 kHz) traduisant une anticipation de la récompense ont été relevées chez le rat lors de la présentation d'un indice associé à une stimulation intracraniale dans l'hypothalamus latéral (Burgdorf et al., 2000). Au niveau neurochimique, les travaux de Schultz chez le primate non humain ont montré que les neurones dopaminergiques jouaient un rôle primordial dans les phénomènes d'anticipation : de décharges dopaminergiques lors de la présentation d'une récompense, il se produit un transfert en faveur d'une décharge de dopamine lors de la présentation d'un indice signalant la disponibilité imminente de la récompense (Schultz, 1998).

Au sein de notre laboratoire, des augmentations d'enképhalines, des peptides opioïdes endogènes (Nieto et al., 2002) et de dopamine (Benturquia et al., 2008) ont été montrées dans le Nac de rats ayant développé une préférence de place à la morphine. Cette augmentation spontanée survient au moment où l'animal est replacé dans l'environnement précédemment associé à la drogue sans qu'aucune injection de morphine ne soit réalisée. Il pourrait s'agir ici du souvenir d'une récompense préalablement obtenue qui se traduirait par des modifications neurochimiques.

Chez l'homme, en modélisant un *craving* pour la cocaïne via la présentation de vidéos liées à la drogue aux sujets, une augmentation du flux sanguin vers certaines régions limbiques telle que l'amygdale a été

rapportée. Une activation du système limbique fait donc partie du *craving* à la cocaïne induit par les indices (Childress et al., 1999).

Au-delà de ces stimuli contextuels, il a été proposé que **l'heure de la journée** associée à la prise de drogue **puisse influencer le comportement de recherche de drogue** : en augmentant les symptômes de sevrage, en éveillant un état interne à la recherche de produits, ou encore en augmentant la sensibilité aux indices associés à la drogue à ces moments précis (Kosobud et al., 2007).

Cette anticipation peut être évaluée au niveau comportemental chez le rongeur en mesurant leur activité spontanée sur une roue. Par exemple, chez des rates injectées avec de la méthamphétamine à des moments précis de la journée pendant plusieurs jours (de 17 à 20 jours) en cycle de lumière constant, une activité sur la roue a été relevée à l'heure habituelle d'injection, et persiste durant 5 heures (Kosobud et al., 1998), alors qu'aucune injection de méthamphétamine n'est réalisée. Le même phénomène est également rapporté avec la nicotine et avec le fentanyl, un agoniste opioïde, où l'activité locomotrice est élevée 1 à 2 heures avant l'heure d'injection, et cette activité perdure 2 à 3 jours après l'arrêt du fentanyl (Gillman et al., 2009). D'autres études en revanche ne relatent pas cette anticipation comportementale de la récompense. En effet, l'âge (Shibata et al., 1994), le sexe et le cycle nyctéméral sont des facteurs qui influencent l'expression de cette anticipation contrôlée par les rythmes circadiens. Enfin, cette anticipation ne semble pas être spécifique des drogues car elle est également observée avec des récompenses naturelles. Par exemple, une étude a montré le développement d'une anticipation de nourriture palatable (le nombre de redressement dans la cage d'activité locomotrice) ou de nourriture standard chez des rats restreints en nourriture (Barbano and Cador, 2005). Ce phénomène semble être dépendant de la dopamine : l'injection systémique d'un antagoniste dopaminergique diminue le comportement de redressement chez les rats restreints (Barbano and Cador, 2006). D'autre part, un comportement de préférence de place avec de la nourriture palatable chez le ouistiti a été rapporté lorsque le test est réalisé aux mêmes heures que les conditionnements passés (Monclaro et al., 2014).

Au niveau neurochimique, il a été montré qu'après 14 jours d'auto-administration de faibles doses de cocaïne, le rythme cardiaque et la température corporelle des animaux augmentent spontanément à l'heure à laquelle les protocoles d'auto-administration de cocaïne commençaient (Tornatzky and Miczek, 1999). Au laboratoire, après 14 jours d'administrations passives de cocaïne, une augmentation spontanée de dopamine dans le Nac a été mesurée, au 1^{er} et au 14^{ème} jour de sevrage, spécifiquement à l'heure où les animaux recevaient l'injection de cocaïne (Puig et al., 2012), ce qui suggère **l'existence d'une mémoire des injections de drogues qui persiste dans le temps**.

Les résultats principaux de ce travail de thèse ont été obtenus après un traitement avec un opiacé : la morphine. Aussi, le chapitre suivant se consacre à la description de la neuroplasticité engendrée par les opiacés.

CHAPITRE 2 : LA NEUROPLASTICITÉ INDUITE PAR LES OPIOÏDES

NEUROPHARMACOLOGIE DES OPIACÉS

Présentation générale

Le pavot à opium était cultivé en Mésopotamie 3400 ans avant J-C. L'opium correspond à un ensemble d'alcaloïdes provenant de la graine de pavot. Les **opiacés** désignent les **dérivés de l'opium**. Quatre alcaloïdes naturels peuvent en être isolés : la morphine, la codéine, la papavérine et la thébaïne. Les **opioïdes** sont **toutes les molécules**, y compris de synthèse, qui vont **se lier aux récepteurs opioïdes**. Les opioïdes sont largement utilisés en traitement aigu et chronique des douleurs modérées et sévères. L'inconvénient **majeur limitant leur utilisation prolongée** est surtout lié à leurs propriétés toxicomanogènes. Parmi les effets autres secondaires importants, on note également un ralentissement de la motilité gastro-intestinale et des dépressions respiratoires (Feng et al., 2012).

Lorsque l'on compare les réponses induites par les agonistes, il est important d'avoir une idée de leur **efficacité**, c'est-à-dire de la capacité des agonistes à induire une réponse via un récepteur donné dans un tissu spécifique. Selon leurs effets sur les récepteurs, on classe les opioïdes en différentes catégories : agonistes, agonistes partiels ou antagonistes. La réponse maximale sera obtenue avec un agoniste pur (comme la morphine ou le fentanyl), les agonistes partiels (la buprénorphine par exemple) se lieront au récepteur mais ne provoqueront qu'une réponse partielle, indépendamment de la quantité administrée. Il existe également des agonistes biaisés : les ligands sélectifs pour un même récepteur seront capables d'activer différentes voies de signalisation associées au récepteur. Enfin, un antagoniste (tel que la naloxone) ne produira aucune réponse fonctionnelle mais empêchera un agoniste de se lier au récepteur.

PROPRIÉTÉS PHARMACOLOGIQUES DE LA MORPHINE

Au cours de ces travaux de thèse, c'est la morphine qui a été utilisée. Son métabolisme va donc être détaillé spécifiquement dans la partie ci-dessous.

Métabolisme de la morphine :

Chez les mammifères, la voie métabolique principale de la morphine est la **glucuronidation**, catalysée par les enzymes UDP-glucuronyltransferase (UGT). Parmi les enzymes UGTs, l'UGT2B7 est l'isoforme majeure responsable du métabolisme de la morphine chez l'homme. La glucuroconjugaison du groupe OH en position 3 et 6 de la morphine va donner 2 métabolites (figure 8) qui sont respectivement la morphine-6-glucuronide (M6G) et la morphine-3-glucuronide (M3G). Ce dernier, bien que ne possédant pas de propriétés analgésiantes, est le métabolite majeur de la morphine (Yoshimura et al., 1973).

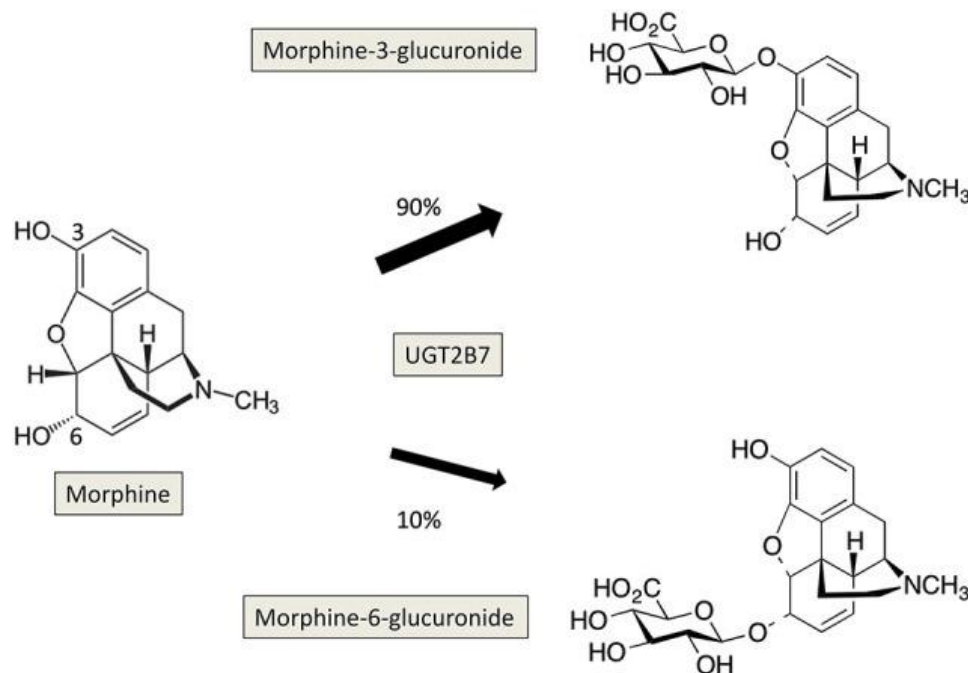


Figure 8: La glucuronidation de la morphine par l'enzyme UDP-glucuronyltransférase (UGT) 2B7

La réaction de glucuronidation de la morphine se produit sur les 2 groupes hydroxyle en position 3 et 6 de la morphine, et amène à la formation de la morphine 3-glucuronide et morphine 6-glucuronide, ces deux molécules ayant des propriétés pharmacologiques différentes, (Ouzzine et al., 2014).

Si en premier lieu la morphine est métabolisée dans le foie, on retrouve dans des homogénats de cerveaux humains les métabolites M3G et M6G à des concentrations de l'ordre du nanomolaire. La plupart des effets analgésiques de la morphine seraient dus au métabolite M6G plus qu'à la morphine elle-même, car le M6G est également un agoniste des récepteurs μ (De Gregori et al., 2012; Pasternak et al., 1987). En administrant le M6G directement au niveau intracérébroventriculaire, l'activité analgésique observée est très puissante (Abbott and Palmour, 1988; Christrup, 1997; Okura et al., 2003). Par contre, lorsqu'il est administré par voie systémique, l'effet analg  siant du M6G est beaucoup moins important que celui de la morphine à cause de la faible perméabilité de la BHE pour le M6G (Wu et al., 1997; Yoshimura et al., 1973). Le transport de M6G au niveau de la BHE a été montré comme étant indépendant de la glycopro  ine P (P-gp), un transporteur membranaire appartenant à la famille des transporteurs ABC (Bourasset et al., 2003). Une étude plus récente démontre néanmoins que le M6G serait non seulement un substrat de la P-gp, mais également des transporteurs du glucose (Sattari et al., 2011).

Il existe d'autres voies métaboliques possibles pour la morphine mais elles sont minimales : la morphine peut être métabolisée en normorphine par N-déméthylation (Smith, 2009).

Les opioïdes endogènes

Les récepteurs aux opioïdes sont normalement activés par des **peptides endogènes, chacun ayant des affinités différentes pour chaque récepteur**. Ces derniers sont largement distribués au sein du système nerveux central et périphérique et sont impliqués dans le contrôle de plusieurs réponses physiologiques tel que la nociception, les comportements émotionnels, l'apprentissage et la mémoire ainsi que la régulation du circuit de la récompense (Bodnar, 2016).

Tous les opioïdes endogènes dérivent de 3 protéines précurseurs. Les **met- et leu- enképhalines** dérivent des pro-enképhalines et sont des ligands ayant une affinité préférentielle pour les récepteurs δ . Les **β -endorphines** dérivent de la pro-opiomélanocortine et se lient avec une plus grande affinité au récepteur μ . Les **dynorphines**, dérivées de la pro-dynorphine ont une meilleure affinité pour les récepteurs κ . Enfin, la nociceptine a une faible affinité pour les récepteurs μ , κ et δ .

Les récepteurs aux opioïdes

Il existe **4 types de récepteurs opioïdes**, qui sont présents dans les voies descendantes modulant la douleur : moelle épinière, locus coeruleus, substance grise périaqueducale, mais également dans les structures limbiques et corticales. Au niveau des organes périphériques, ils sont exprimés au niveau du cœur, des poumons, du foie ou encore du tractus gastro-intestinal. Leurs localisations diff  rent en fonction des organes et des espèces. Cependant, les effets renforçants directs des opioïdes ne se limitent qu'à un petit nombre de régions cérébrales, et c'  st sur ces dernières que l'accent sera porté dans ce chapitre.

Les récepteurs aux opioïdes sont tous des récepteurs à **7 domaines transmembranaires hydrophobes couplés aux protéines $G_{i/o}$** . L'activation des **récepteurs μ** (ou MOR pour morphine opioid receptors) provoquent une analgésie, des dépressions respiratoires, un état d'euphorie, une sédation, une diminution de la motilité gastro-intestinale et une dépendance physique. Ces récepteurs sont p  risynaptiques. Au niveau post-synaptique sur les dendrites et les corps cellulaires, ils vont réguler l'excitabilité neuronale et induire la transduction du signal. Au niveau pré-synaptique sur les axones terminaux, les récepteurs vont inhiber la libération des neurotransmetteurs, via l'activation des conductances potassiques et/ou l'inhibition des conductances calciques (Williams et al., 2001). Les expériences de manipulations génétiques des dernières années ont permis de mettre en évidence le rôle primordial de ces récepteurs dans la dépendance aux opiacés. En effet les souris traitées à la morphine dont le récepteur μ a été inactivé par stratégie knock-out (KO) ne présentent pas de signes somatiques (sauts, reniflements, claquements de dents, tremblements de type   brouements, ptoses, diarrhées) et végétatifs (perte de poids et hypothermie) de sevrage. L'ensemble de ces signes est normalement observé chez les souris sauvages. Une autre étude a également montré l'absence de préférence de place conditionnée pour la morphine chez ces mêmes souris génétiquement modifiées (Kieffer, 1999; Matthes et al., 1996). Dans le Nac, les récepteurs μ sont exprimés préférentiellement sur les neurones portant le récepteur D1 (Georges et al., 1999).

Les **récepteurs δ** (ou DOR, isolés pour la première fois dans le canal d  f  rent) seraient impliqués dans les effets antinociceptifs de certains opioïdes. Certains agonistes réduiraient l'activité gastro-intestinale et causeraient des dépressions respiratoires. Des modèles de souris génétiquement modifiées où le récepteur δ a été inactivé montrent des comportements anxio‐gènes et dépressifs.

Les **récepteurs κ** (pour KOR, nommés à cause du premier ligand connu pour s'y fixer : la ketocyclazocine) provoque une analgésie lorsqu'ils sont activés, ainsi qu'une sédation, des dyspnées, des phénomènes de dépendance, de dysphorie et des dépressions respiratoires. Contrairement au

récepteur μ , la stimulation de ces récepteurs réduit la fonction dopaminergique dans le Nac, ce qui pourrait provoquer les dysphories (Lingford-Hughes and Nutt, 2003).

Enfin plus récemment, un autre récepteur cloné en 1994 a été identifié : le **récepteur nociceptine/orphanine FQ (ORL1)**. Il a pour ligand naturel la **nociceptine**. Cette voie est impliquée dans de nombreuses réponses physiologiques à la fois au niveau du SNC, mais également au niveau périphérique. La nociceptine a des effets pléiotropiques dans l'organisme et sa pharmacologie est très complexe selon les tissus ciblés. Même au sein d'un tissu donné, il existe peu de consensus sur ses effets à l'heure actuelle et d'autres outils pharmacologiques sont nécessaires pour préciser ses fonctions (Lambert, 2008).

Après liaison du ligand (figure 9), la conformation du récepteur change, ce qui active les protéines G intracellulaires. Les protéines G sont constituées de 3 sous-unités : α , β et γ . Les sous-unités β et γ forment un hétérodimère. La sous-unité α de la protéine G expulse le GDP (guanosine diphosphate) auquel elle était liée au profit d'une liaison avec le GTP (guanosine triphosphate). Le complexe α -GTP se dissocie alors des sous-unités β/γ , les rendant toutes libres d'interagir avec des cibles comme des enzymes ou un canal ionique. Il en résultera une **inhibition de l'AMPC**, qui agira tel un second messenger dans la cellule pour activer des protéines kinases et la transcription de gènes. L'une des réponses les plus rapides après activation des récepteurs opio  ides est la régulation de certains canaux ioniques comme **l'inhibition des canaux calciques voltage-dépendants** ou encore la stimulation **des canaux potassiques rectifiant entrant**.    l'échelle cellulaire, l'activation des canaux potassiques provoque une **hyperpolarisation de la membrane des neurones et réduit l'hyperexcitabilité**. L'inhibition des canaux calciques bloque la libération des neurotransmetteurs (Pathan and Williams, 2012; Trescot et al., 2008). Ces phénomènes vont participer au processus de nociception. Les récepteurs aux opio  ides vont aussi activer la phospholipase C (PLC) et la voie des MAP kinases. Le recrutement de la voie des MAP kinase pourrait se faire par le biais du complexe récepteur couplé au protéine G – β -arrestine phosphorylée (Lefkowitz and Shenoy, 2005).

Les structures touchées par les neuroadaptations engendrées par les opiacés sont nombreuses. Le circuit mésocorticolimbique est particulièrement ciblé dont notamment les neurones GABAergiques du Nac, les neurones dopaminergiques de l'ATV et les neurones glutamatergiques du CPF. Par exemple, des rats vont s'autoadministrer des opiacés directement dans l'ATV et dans le Nac. D'autres régions comme la substance grise périaqueducale ou encore le locus coeruleus jouent un rôle important dans les différentes étapes de la dépendance aux opiacés (Maldonado et al., 1992; Rasmussen et al., 1990)

Dans les parties suivantes, l'accent sera porté sur les neuroadaptations ayant lieu dans les régions faisant partie du circuit de la récompense et en particulier le Nac et l'ATV. Une attention particulière est portée sur le récepteur μ sur lequel se lie la morphine, utilisée dans ces travaux de thèse. Les effets physiologiques de la morphine sont absents chez des souris dont le récepteur μ a été inactivé, suggérant que ces récepteurs sont nécessaires dans les effets de cet opiacé (Matthes et al., 1996; Merrer et al., 2009).

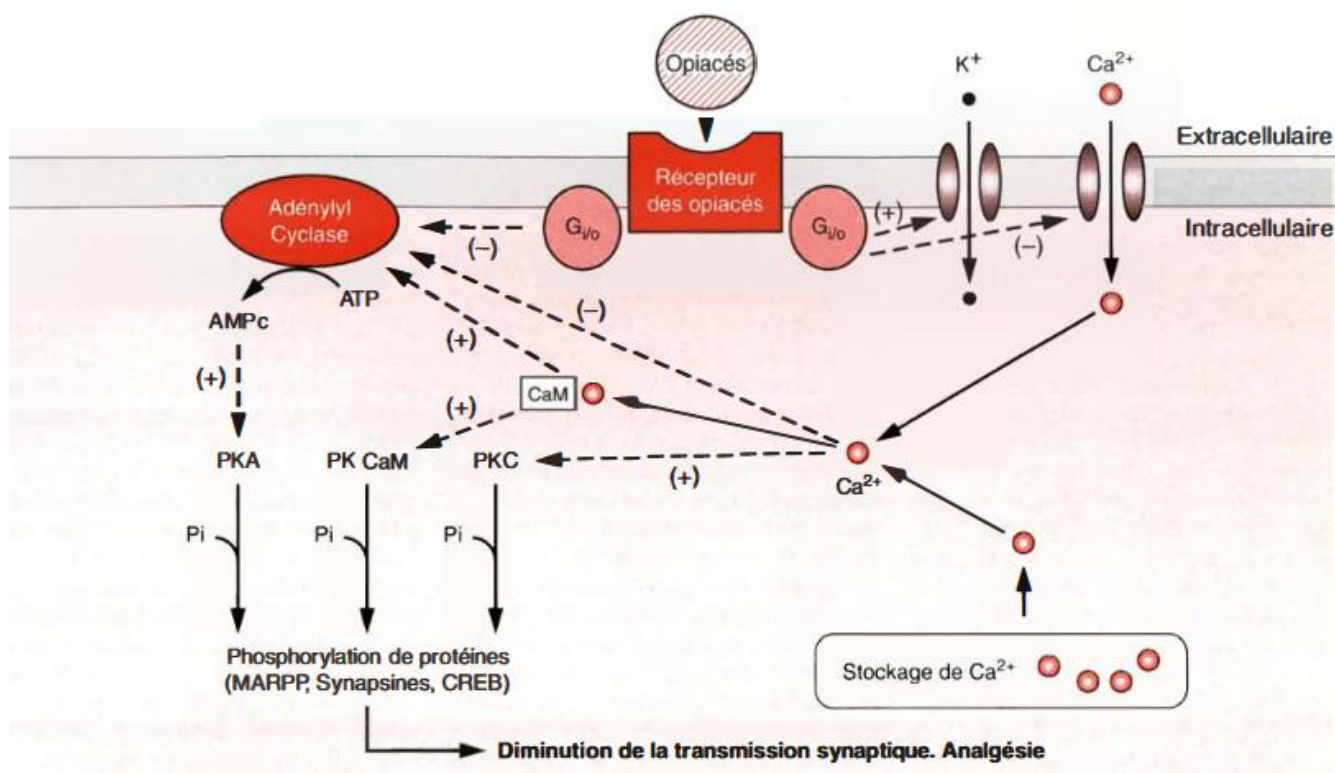


Figure 9 : Conséquence d'un traitement aigu aux opiacés :

L'activation par un ligand entraine une cascade de signalisation intracellulaire qui comprend la stimulation des canaux potassiques (efflux), l'inhibition des canaux calciques voltage-dépendants et l'inhibition de l'adénylate cyclase. AMPC : adénosine monophosphate cyclique, PKA : protéine kinase A, MARPP : Morphine cAMP Regulated PhosphoProteins, CREB : C-AMP Response Element-binding protein, CaM : calmoduline, PKC : protéine kinase C, K⁺ : ion potassium, Ca²⁺ : ion calcium, d'après Noël et al., 1994.

EFFETS D'UN TRAITEMENT AIGU AUX OPIOÏDES

DANS LE NOYAU ACCUMBENS

L'administration aiguë d'opioïdes active les récepteurs μ et **augmente la concentration de dopamine dans le Nac**. En effectuant une lésion bilatérale électrolytique du Nac chez le rat, une diminution des réponses pour l'auto-administration de morphine a été mise en évidence, suggérant donc que le Nac a un rôle dans la motivation à s'auto-injecter de la morphine (Suto et al., 2011). Outre la signalisation dopaminergique, les concentrations de glutamate sont également perturbées par l'administration aiguë d'opiacés mais la littérature reporte des résultats contradictoires. Par exemple, l'administration systémique de morphine provoque une **inhibition de 63% du taux de décharges spontanées des neurones du CPFm** (Giacchino and Henriksen, 1996). Une autre étude réalisée par microdialyse intracérébrale chez le rat rapporte quant à elle une augmentation de glutamate après une injection aiguë de morphine (50 mg/kg, *i.p*) (Huang et al., 1997).

DANS L'AIRE TEGMENTALE VENTRALE

Une injection aiguë de morphine par voie systémique va **augmenter le taux de décharges des neurones dopaminergiques** de l'ATV. En effet, la liaison avec le récepteur μ couplé à une protéine G_i sur les interneurones GABA va diminuer leur activité et donc diminuer la libération de GABA au niveau des neurones dopaminergiques : ces derniers sont donc désinhibés (Johnson and North, 1992). En parallèle, une **redistribution des récepteurs AMPA** est observée à la membrane plasmique après une injection aiguë de morphine (15 mg/kg) chez la souris. En particulier, l'injection de morphine provoque un changement de composition des sous-unités formant le récepteur AMPA avec l'échange de sous-unités GluR2 contre des récepteurs qui en sont dépourvus (Brown et al., 2010).

Les synapses GABAergiques ne sont également pas épargnées et la morphine semble pouvoir réguler de façon bidirectionnelle la plasticité synaptique GABAergique au sein de l'ATV. Dans un protocole de stimulation à haute fréquence, il est possible d'induire une potentialisation à long terme (LTP) au niveau des terminaisons GABAergiques. Ce phénomène est dépendant à la fois des récepteur NMDA post-synaptiques, et de la libération de monoxyde d'azote provenant des neurones dopaminergiques (Nugent and Kauer, 2008). Via une stimulation de la guanylyl cyclase (GC) dans le neurone GABA, une augmentation de la libération de GABA est observée ainsi qu'une LTP. Une dose aiguë de morphine

va inhiber cette LTP dépendante du GABA en altérant la signalisation NO-GC. Il en résulte une perte du contrôle inhibiteur, un mécanisme qui peut aussi expliquer l'augmentation de l'activité des neurones dopaminergiques lors d'un traitement aiguë aux opiacés dans l'ATV (Niehaus et al., 2010). Enfin, un phénomène de dépression à long terme (LTD) a également été mis en évidence au niveau des synapses GABAergiques sur les neurones dopaminergiques. Une injection de morphine prévient ce phénomène de LTD dans l'ATV (Dacher and Nugent, 2011).

L'administration répétée d'opioïdes va entraîner la mise en place d'adaptations à court terme mais également de façon prolongée dans les neurones sensibles aux opioïdes et plus largement au niveau des réseaux de neurones. Un de ces mécanismes est la **tolérance**, qui va se mettre en place à l'échelle du récepteur, mais également au niveau d'un ensemble de neurones, où des contre-adaptations tentent de ramener le système à un fonctionnement normal malgré la présence continue de la drogue. À plus long terme, c'est le phénomène de **dépendance** qui apparaît, tant sur le plan physique que psychique. La tolérance et la dépendance ne sont pas forcément liées de façon causale.

EFFETS D'UN TRAITEMENT CHRONIQUE AUX OPIOÏDES

SUPERACTIVATION DE L'ADÉNYLATE CYCLASE

Lorsque la morphine n'est pas administrée de façon continue, ou lors d'un sevrage précipité de façon pharmacologique, le taux d'AMPC augmente considérablement (Williams et al., 2001). Cette régulation positive de la voie de l'AMPC active la protéine kinase A, et cette dernière phosphoryle un nombre important de substrats. Parmi eux, le facteur CREB (C-AMP Response Element-binding protein) et les sous-unités des récepteurs AMPA (GluR1 en particulier) sont des cibles. Ces 2 phénomènes requièrent en amont l'activation des récepteurs NMDA, montrant le lien entre la transmission glutamatergique et les récepteurs μ .

Pour expliquer cette superactivation de la voie adénylate-cyclase – AMPC, des études ont montré que les récepteurs μ pouvaient interagir non plus avec la protéine G_i , mais avec la protéine G_s , proposant ainsi un changement vers des effets stimulants (Chakrabarti et al., 2005; Gintzler and Chakrabarti, 2006).

NOTION DE TOLÉRANCE

Si la morphine et les agonistes μ en général sont les plus efficaces pour soulager immédiatement les douleurs sévères, le phénomène de tolérance aux effets analgésiques et les syndromes de sevrage sévères associés à l'arrêt de la prise de l'opiacé limitent leur usage à long terme. La **tolérance aux opio  ides** se caractérise par **une réponse réduite à un agoniste opio  ide** et se manifeste par le **besoin d'augmenter les doses pour obtenir l'effet recherché**. Le phénomène de tolérance peut être mesuré au niveau cellulaire via les systèmes de seconds messagers, en mesurant par exemple l'inhibition de l'adénylate cyclase ou l'efficacité des canaux ioniques. Chez les addicts, les consommations quotidiennes peuvent aller de 10 à 100 fois plus que les doses aiguës efficaces (Christie, 2008)

L'arrêt brutal de la consommation après usage chronique va provoquer d'intenses **symptômes de sevrage** qui vont se manifester chez les individus. Dans la phase aiguë de ce syndrome de sevrage, la nature aversive des effets va contribuer au fort taux de rechutes.

La tolérance aux opio  ides

Le développement de la tolérance se fait via la perte partielle de la capacité du récepteur μ à activer les cascades de signalisation intracellulaire au cours du temps. Les mécanismes de la tolérance comprennent la **diminution du nombre de récepteurs fonctionnels à la surface cellulaire** ou encore **la réduction de l'efficacité du couplage entre le récepteur μ et ses effecteurs**. L'ensemble de ces mécanismes va être explicité ci-après.

Régulation du nombre de récepteurs en surface

La diminution de la synthèse des récepteurs ou l'internalisation et la dégradation des récepteurs contribuent à réguler négativement le nombre de récepteurs à la surface cellulaire. En diminuant la quantité de récepteurs pouvant être activés, le phénomène de tolérance pourrait donc être observé. Une étude a montré par exemple qu'un traitement chronique avec de fortes doses d'Étorphine r  gulait négativement les récepteurs μ , chaque cycle d'internalisation étant destiné à la dégradation via les lysosomes (Patel et al., 2002).

Cependant, des données suggèrent que cette régulation n'est pas obligatoire pour observer une tolérance, et des études réalisées *in vivo* ont montré qu'un traitement chronique aux opioïdes pouvait résulter selon les études en une régulation positive des récepteurs en surface, ou bien à aucun changement dans le nombre des récepteurs (Al-Hasani and Bruchas, 2011).

Désensibilisation des récepteurs et phosphorylation

La première étape de la désensibilisation réside en la phosphorylation du récepteur activé, par les protéines sérine/thréonine kinases spécifiques nommées GRK (G-protein-coupled receptor kinases). Ce mécanisme est suivi par la liaison des récepteurs avec la β -arrestine. Ceci provoque le découplage fonctionnel entre le récepteur et ses protéines G. Chez des souris traitées chroniquement avec la morphine et dont la β -arrestine-2 a été inactivée (modèle KO, β -arrestine 2 $-/-$), la désensibilisation du récepteur et le développement de la tolérance aux effets anti-nociceptifs n'ont pas lieu. En l'absence de tolérance à la morphine, les signes de dépendance physique chez les souris mutantes persistent, mettant alors en évidence que les mécanismes biochimiques qui sous-tendent tolérance et dépendance sont différents (Bohn et al., 2000).

Endocytose

Le récepteur peut être internalisé par une voie dépendante de la clathrine et peut être recyclé à la membrane plasmique (ce qui va freiner la désensibilisation car le récepteur pourra être de nouveau actif), ou bien dégradé dans les lysosomes (dans ce cas, cela augmentera la désensibilisation des récepteurs) (Moore et al., 2007). La préférence pour une des deux voies semble être dépendante de la nature de l'agoniste : avec l'étorphine, le récepteur est préférentiellement recyclé tandis qu'avec des agonistes peptidiques les récepteurs sont plutôt dégradés et vont donc provoquer une désensibilisation plus importante (Marie et al., 2003).

Activation des systèmes anti-opioïdes

Les phénomènes de tolérance ont été très étudiés à l'échelle du récepteur, mais dans une approche plus intégrée, des neuroadaptations pour contrer les effets des opioïdes ont été observées. On parle de mise en place de **systèmes anti-opioïdes par le SNC**, dans le but de ramener l'organisme intoxiqué vers l'homéostasie.

Par exemple, lorsque l'organisme est exposé de façon chronique avec la morphine, une synthèse de neuropeptide va avoir lieu pour moduler les effets antinociceptifs. Il a été suggéré que la synthèse de ces peptides soit aussi liée au processus de tolérance. A l'arrêt de la consommation, il y a un excès de ces peptides anti-opioïdes et ces derniers pourraient être à l'origine des symptômes de sevrage. Le neuropeptide FF (NPFF), la dynorphine ou encore la cholecystokinine (CCK) font partie des peptides anti-opioïdes.

TOLÉRANCE : LE CAS PARTICULIER DE LA MORPHINE

La régulation des récepteurs μ est très dépendante des agonistes. En effet, en fonction du ligand, le récepteur va activer différentes voies de signalisation dont certaines pourraient participer au développement de la tolérance. Ainsi, la tolérance aux effets analgésiques de la morphine, mesurée par un test de retrait de la queue après immersion dans l'eau chaude, est bloquée par inhibition de la kinase JNK (c-Jun N-terminal kinases). En revanche, sur des souris dont la GRK3 est inactivée, la tolérance aux effets analgésiques de la morphine est similaire par rapport aux souris contrôles. En étudiant la tolérance aux effets analgésiques du fentanyl, de la méthadone ou encore de l'oxycodone, cette même étude montre que la tolérance aux effets analgésiques de ces opioïdes est bloquée chez les souris mutées pour la GRK3, et sans effet lors de l'inhibition de JNK (Melief et al., 2010). L'utilisation d'agonistes biaisés permettrait de mieux comprendre l'implication des seconds messagers dans le développement de la tolérance. Très récemment, il a été montré qu'une mutation dans la partie C-terminale du récepteur μ (sur un site pouvant être phosphorylé) bloquait la tolérance à la morphine et à l'éthorphine (Wang et al., 2016), constituant ainsi une nouvelle cible pour moduler la tolérance aux opioïdes.

La désensibilisation du récepteur

L'augmentation de la désensibilisation des récepteurs μ pourrait être un mécanisme important dans la tolérance à la morphine. Il a en effet été montré une désensibilisation des récepteurs μ et δ chez le rat après un traitement chronique à la morphine, dans la substance grise périaqueducule et le thalamus. Cependant, ce phénomène ne se généralise pas à toutes les régions du cerveau : dans le Nac et dans le caudé putamen, la désensibilisation des récepteurs μ n'a pas été observée (Noble and Cox, 1996). Dans une culture corticale de neurones, il a également été montré que la morphine provoquait une désensibilisation du récepteur μ via une phosphorylation prolongée et spécifique de la sérine 375 du récepteur (Schulz et al., 2004). Cette phosphorylation est catalysée par la GRK5 dans

des cellules HEK 293 (Doll et al., 2012). Une étude *in vivo* a également montré le rôle de la β -arrestine 2 : dans un modèle où elle est inactivée chez la souris, Bohn et ses collaborateurs ont montré l'absence de désensibilisation du récepteur μ après traitement chronique à la morphine, et l'absence de développement de la tolérance aux effets antinociceptifs (Bohn et al., 2000).

Une des théories se proposant d'expliquer la tolérance à la morphine postule que le récepteur désensibilisé reste à la membrane plasmique dans un état phosphorylé pendant une période prolongée, et ne poursuit pas l'étape « normale » de déphosphorylation dans les endosomes et ré-adressage à la membrane dans un état resensibilisé.

L'endocytose du récepteur

L'amplitude du signal d'un complexe récepteur – ligand va être contrôlée par l'affinité du ligand pour le récepteur, son efficacité, sa demi-vie, tout ceci constituant l'activité relative du ligand pour le récepteur μ . Cela reflète en quelque sorte la force de couplage avec le récepteur. La durée à laquelle le récepteur reste couplé à la protéine G va également contribuer à l'amplitude du signal et ceci est en parti dépendant de la désensibilisation du récepteur et de son endocytose. Ainsi, Whistler et ses collaborateurs ont proposé que chaque complexe ligand-récepteur avait un ratio nommé « RAVE » (Relative Activity Versus Endocytosis) particulier (Whistler et al., 1999)

Par exemple, les peptides opioïdes endogènes comme les enképhalines sont efficaces sur les récepteurs μ , et induisent une désensibilisation et l'endocytose du récepteur. Le ratio RAVE est donc équilibré. Selon la théorie RAVE, plus ce ratio se rapproche de l'équilibre, moins on observera de phénomène de tolérance et de dépendance (Martini and Whistler, 2007). Pour la morphine, le phénomène est plus complexe. En effet, l'effet analgésique puissant de la morphine reflète une activité relative très bonne sur le récepteur μ . Par contre, plusieurs études ont montré **l'absence d'internalisation du récepteur avec la morphine** (Sternini et al., 1996). Via une mutation sur le récepteur μ rendant possible son endocytose, Kim et ses collaborateurs ont montré une réduction de la tolérance aux effets analgésiques de la morphine, par rapport aux animaux présentant le récepteur non muté (Kim et al., 2008)

Pour expliquer le développement de la tolérance, une autre théorie propose que la morphine induirait une **superactivation de l'adénylate cyclase**, supérieure à celle des autres opioïdes et que dans ce sens, elle exacerberait le développement de la tolérance. Une réduction de la tolérance et de la superactivation de l'AMPc sont en effet observées dans des cellules HEK 293 lorsque le récepteur μ est muté pour permettre son endocytose après traitement chronique à la morphine (Finn and

Whistler, 2001). Depuis, il a été montré que la superactivation de l'adénylate cyclase n'était pas dépendante de l'internalisation du récepteur, mais plutôt de la localisation du récepteur μ au niveau des radeaux lipidiques contenant des microdomaines riches en cavéolines (Zhao et al., 2006).

EFFETS D'UN TRAITEMENT CHRONIQUE DANS LE NOYAU ACCUMBENS

L'activation chronique des récepteurs μ va provoquer des adaptations dans la signalisation de l'AMPc et la quantité d'adénylate cyclase est ainsi augmentée (Williams et al., 2001). Ceci va provoquer de nombreux changements, notamment dans la signalisation d'autres récepteurs couplés aux protéines G, comme les récepteur glutamatergique mGlu. Martin et ses collaborateurs ont notamment montré qu'après un traitement chronique à la morphine, l'efficacité d'inhibition des récepteurs pré-synaptique mGluR2/3 sur la libération de glutamate était augmentée, potentiellement à cause de l'augmentation de la signalisation liée à l'AMPc (Martin et al., 1999).

Après 14 jours d'injections non contingentes de morphine à doses croissantes, l'expression des sous unités GluR1 est diminuée à la membrane plasmique, spécifiquement dans les neurones exprimant le récepteur D1 dans le Nac shell (Glass et al., 2008). Quant aux récepteurs NMDA, une diminution de l'affinité avec la glycine (co-agoniste du récepteur NMDA) et une diminution de l'activation de la PKC via le récepteur ont été démontrées sur des tranches de cerveaux de rats traités de façon chronique à la morphine (Martin et al., 2004). Ces effets pourraient être liés à une augmentation de l'expression ou de la fonction des sous-unités NR2A. Ce dernier résultat a également été *confirmé in vivo* (Murray et al., 2007).

EFFETS D'UN TRAITEMENT CHRONIQUE DANS L'AIRE TEGMENTALE VENTRALE

L'aire tegmentale ventrale constitue une des cibles des opiacés : des injections d'opiacés y provoquent de forts effets renforçants dans des paradigmes de préférence de place ou d'auto-administration (Ting-A-Kee and van der Kooy, 2012).

L'activité de décharge des neurones dopaminergiques de l'ATV est augmentée lors d'un traitement chronique à la morphine. Georges et ses collaborateurs ont montré une augmentation du taux de décharge des neurones dopaminergiques chez des rats dépendants à la morphine (Georges et al., 2006). Un traitement chronique à la morphine diminue également l'expression des sous-unités de

deux canaux potassiques : KCNAB2 et GIRK3, ce qui va dans le sens d'une augmentation de l'excitabilité neuronale (Mazei-Robison et al., 2011).

Au niveau morphologique, une diminution de la taille du soma des neurones dopaminergiques a été reportée (figure 10). En particulier, une diminution de la surface des neurones dopaminergiques de l'ATV a été observée après administration chronique de morphine (Skclair-Tavron et al., 1996). Les neurones dopaminergiques sont donc plus enclin à décharger, mais leur plus petite taille fait qu'ils libèrent moins de dopamine dans le Nac.

Au niveau de la transmission glutamatergique, une augmentation des sous-unités GluR1 et NR1 est observée. La signalisation calcique est donc augmentée (en l'absence de sous unité GluR2), ce qui renforce l'efficacité des connections synaptiques.

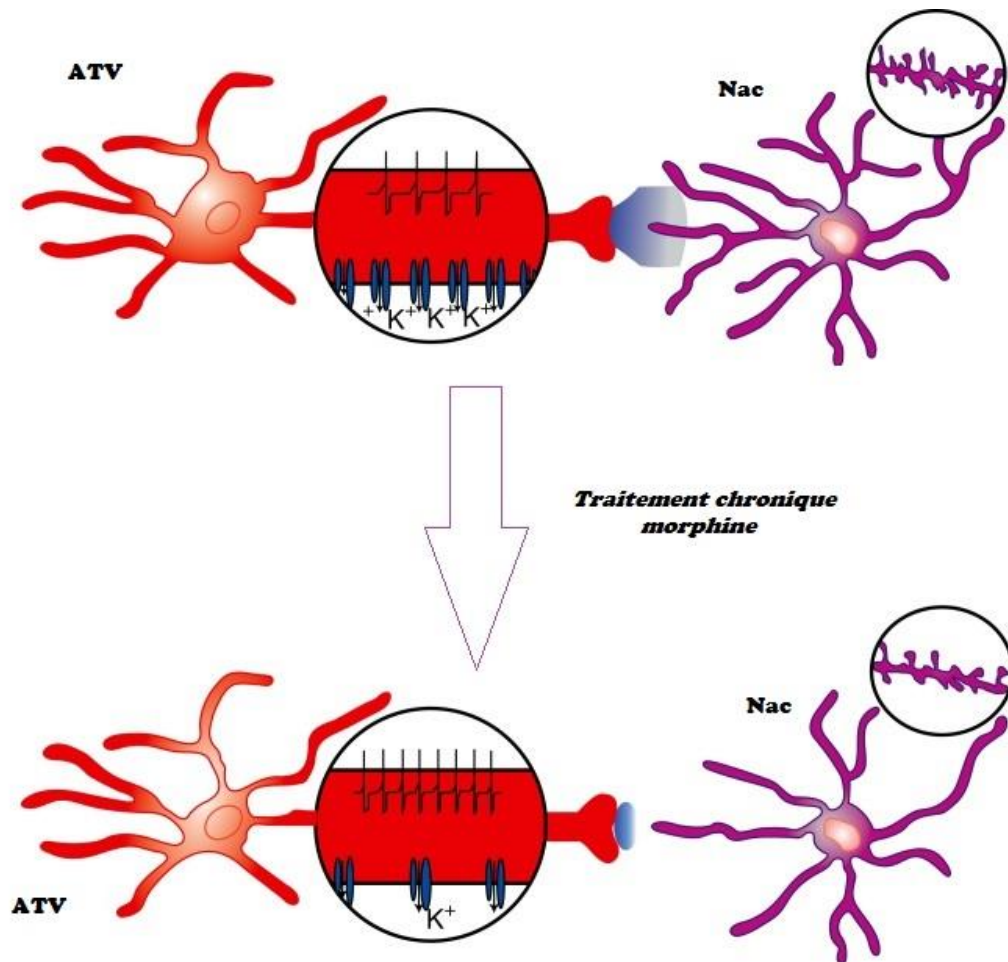


Figure 10 : Plasticité cellulaire et moléculaire dans l'ATV et le Nac après un traitement chronique à la morphine

La morphine diminue la taille du soma des neurones de l'ATV et augmente l'excitabilité neuronale (via la suppression des canaux potassiques). La transmission dopaminergique dans le Nac est alors diminuée, ainsi que la densité des épines dendritiques dans les neurones épineux moyens du Nac. Schéma modifié d'après Mazei-Robison et al., 2011.

SEVRAGE

Le sevrage après une exposition prolongée va démasquer les adaptations neuronales mises en place dans le cerveau pour s'adapter à la présence continue de la drogue. Ainsi, les circuits régulant la fonction gastro-intestinale ou encore l'état affectif vont être perturbés et les syndromes de sevrage aux opiacés vont apparaître. La réduction du taux de décharge des neurones dopaminergiques et la moindre libération du neurotransmetteur vers les cibles vont provoquer l'anxiété, la dysphorie ou encore l'irritabilité. D'autres circuits neuronaux et médiateurs (le facteur CRF (corticotrophin releasing factor), la dynorphine) vont également être touchés en dehors du circuit mésocorticolimbique.

DANS LE NOYAU ACCUMBENS

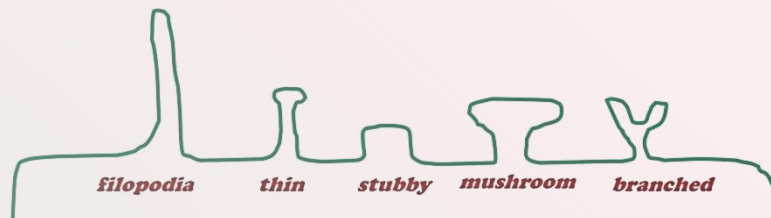
En enlevant le tonus inhibiteur sur les récepteurs μ , l'activité neuronale générale et la libération de neurotransmetteurs est augmentée lors du sevrage. En particulier, les taux extracellulaires de GABA (Chieng and Williams, 1998) et de glutamate augmentent dans le Nac (Sepúlveda et al., 2004). Des injections d'antagonistes des récepteurs AMPA et NMDA au niveau systémique ou en intracérébroventriculaire vont d'ailleurs réduire les symptômes de sevrage. Une étude récente a montré que l'augmentation de la libération de glutamate lors du sevrage avait lieu spécifiquement au niveau des neurones dopaminergiques exprimant le récepteur D1 dans le Nac (Hearing et al., 2016). Une augmentation des sous-unités NR1 des récepteurs NMDA lors du sevrage à la morphine, dans le core et dans le shell du Nac a également été reportée. Les protéines FosB/ Δ FosB, marqueur de plasticité neuronale étaient également colocalisés avec ces sous-unités glutamatergiques (Zhang et al., 2016).

La morphine modifie également la **morphologie des neurones**. En effet, des rats traités de façon chronique à des doses croissantes de morphine pendant 14 jours présentent une **diminution des épines dendritiques** (encadré 3) au niveau des dendrites de second-ordre dans le Nac shell **au cours du sevrage**.

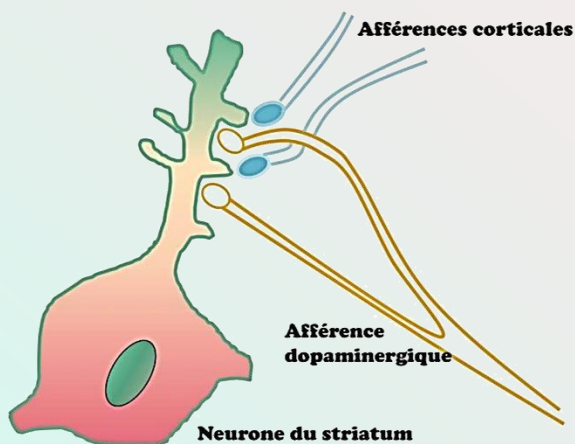
Cette diminution perdure jusqu'à 14 jours après la dernière injection de morphine et est décorrélée de la présence de symptômes somatiques du sevrage, ces derniers ne perdurant que 3 jours après l'arrêt du traitement (Spiga et al., 2005). Une diminution de l'arborisation dendritique (diminution de

la longueur des dendrites et du nombre de branchements par neurones) a également été observée spécifiquement dans le core du Nac lors d'un protocole d'extinction d'une préférence de place conditionnée à la morphine. Cette observation était également accompagnée d'une diminution du marqueur neuronal c-fos (Leite-Morris et al., 2014). Dans le shell, 1 mois après un traitement chronique à la morphine, une diminution des épines dendritiques a également été observée quelle que soit la contingence de l'administration de morphine (expérimentateur *versus* auto-administration) (Robinson et al., 2002).

Les épines dendritiques



Les épines dendritiques sont des **protrusions de la membrane plasmique des neurones** qui forment des **structures postsynaptiques spécialisées dans la transmission synaptique** (Nimchinsky et al., 2002).



Selon leur forme et leur taille, les épines dendritiques sont classées en différentes catégories. Les filopodes sont les plus labiles et peuvent être éliminés en quelques heures (Alvarez and Barney, 2007).

Les épines **fines** et les épines dépourvues de cou (« stubby ») ont un phénotype **immature** et sont très **labiles** alors que les **épines en forme de champignon** (« mushroom ») sont plus **matures** et peuvent persister au cours du temps (Radley et al., 2006).

Dans les neurones épineux moyens du striatum, il a été montré que la **tête des épines** dendritiques recevait des **afférences glutamatergiques** excitatrices en provenance du cortex. Le **cou des épines dendritiques** reçoit quant à lui des **afférences dopaminergiques**, modulant ainsi la réponse des épines post-synaptiques à la libération de glutamate (Di Maio et al., 2016).

Encadré 3 : Les épines dendritiques : définition et morphologie

Schéma modifié et réalisé d'après Hyman and Malenka, 2001.

DANS L'AIRE TEGMENTALE VENTRALE

Une perturbation des systèmes dopaminergiques, glutamatergiques et GABAergiques est observée lors du sevrage après un traitement chronique aux opiacés. En particulier, dans l'aire tegmentale ventrale, une augmentation de la libération de GABA (Bonci and Williams, 1997) et une diminution de celle de glutamate (Manzoni and Williams, 1999) sont en faveur d'une inhibition de l'activité neuronale dopaminergique. La réduction de l'activité des systèmes dopaminergiques est un des éléments qui contribue à un état émotionnel négatif lors du sevrage.

La perturbation de la balance GABA/glutamate semble être dépendante du temps : si l'effet immédiat du sevrage tend vers une augmentation de la libération de GABA et de glutamate, l'activation des récepteurs GABA_B et mGluR2/3 au niveau des terminaisons glutamatergiques tend ensuite vers une diminution de la transmission glutamatergique.

Une étude récente a montré que la photostimulation des neurones GABAergiques de la queue de l'aire tegmentale ventrale (ATVt) inhibe les neurones dopaminergiques de l'ATV chez des rats naïfs et en sevrage depuis 14 jours après un traitement chronique à la morphine. En revanche, l'inhibition des neurones de l'ATVt n'active pas les neurones dopaminergiques chez les rats en sevrage à la morphine, autrement dit, l'inhibition des neurones dopaminergiques est possible alors que leur désinhibition ne l'est pas. Si les neurones dopaminergiques de l'ATV ne répondent plus à un traitement aigu aux opiacés lors du sevrage, il est donc probable que cela soit due à la diminution de l'activité tonique des neurones de l'ATVt (moins de désinhibition des neurones dopaminergiques) et à la diminution des décharges toniques glutamatergiques dans les neurones dopaminergiques de l'ATV (Kaufling and Aston-Jones, 2015). Ainsi, l'ATVt maintient la transmission d'informations négatives/aversives via une inhibition des neurones dopaminergiques, mais ne produit plus d'effet positif récompensant via la désinhibition. Ceci pourrait être responsable de l'état anhédonique observé lors du sevrage prolongé aux opiacés.

Au niveau morphologique, comme évoqué précédemment, une diminution de la taille des neurones dopaminergiques est observée après un traitement chronique à la morphine. Cette diminution persiste même après 14 jours d'arrêt du traitement, puis revient à la morphologie de départ après 30 jours d'arrêt du traitement (Skclair-Tavron et al., 1996).

A l'heure actuelle, **aucun traitement ne prévient les épisodes de rechutes** (Dennis et al., 2014), qui restent le problème majeur dans la prise en charge de l'addiction. Les questionnaires mis en place

par les cliniciens se basent sur les déclarations des patients, dont la conscience de leur état a été rapportée comme pouvant être erronée. En effet, il a été décrit **une diminution de la perception de la nécessité d'un traitement** chez les patients, par une **surestimation de leur capacité à contrôler leur consommation** (Verdejo-García et al., 2013).

Il est donc urgent de trouver des **marqueurs objectifs**, reflétant l'état physiopathologique du patient à un moment donné, et permettant, par des analyses régulières, de **prédire un état de vulnérabilité à la rechute**. Depuis quelques années, le facteur neurotrophique dérivé du cerveau, ou BDNF (pour Brain-Derived Neurotrophic Factor) est proposé comme pouvant être un bon biomarqueur de la rechute (D'Sa et al., 2011). Le chapitre 3 présente ce facteur, de ses caractéristiques à l'échelle moléculaire vers son rôle physiologique. Enfin les altérations de BDNF dans l'addiction sont reportées.

CHAPITRE 3 : LE BDNF

DÉCOUVERTE ET DEFINITION

Le BDNF a été découvert et **isolé pour la première fois en 1982** dans le cerveau de porc (Barde et al., 1982). À ce moment-là, il était décrit comme participant à la survie de neurones en culture. Au même titre que le NGF (Nerve Growth Factor) découvert 30 années auparavant, et des facteurs NT-3 /4/5/6 (neurotrophin-3/4/5/6), il fait partie de la **famille des facteurs neurotrophiques**, qui sont de petites protéines sécrétées.

De par ses fonctions variées, le BDNF est sujet à de **nombreux mécanismes de régulation** à différents niveaux. Il existe en effet des régulations au niveau transcriptionnel, traductionnel, du clivage enzymatique et encore au niveau du transport de l'ARNm et de la protéine.

LE GÈNE DU BDNF : STRUCTURE ET RÉGULATION

Décrite et révisée plusieurs fois, l'organisation du gène du BDNF est complexe. **Chez l'homme**, le gène est localisé sur le chromosome 11 et est constitué de **11 exons** ainsi que de 9 promoteurs fonctionnels indépendants (figure 11A) (Pruunsild et al., 2007). Il existe des sites d'épissages alternatifs dans les exons II et IX. Des codons qui initient la traduction de la protéine sont présents sur les exons I, VII, VIII, et IX. Les formes pré-proBDNF auront donc des séquences peptides signaux dans la partie N-terminale qui seront différentes, mais toutes contiendront l'exon IX, codant pour le préproBDNF. Par ailleurs, la région 3' UTR contenant 2 sites de polyadénylation, chaque transcrit primaire peut exister sous une forme courte ou bien sous une forme longue, les 2 codant la même protéine BDNF. Enfin, il existe un transcrit « anti-sens », synthétisé à partir du brin d'ADN opposé qui réprime les niveaux de transcrit de BDNF (Bouille et al., 2012; Liu et al., 2005). Le transcrit anti-sens modifierait la chromatine (triméthylation de l'histone répresseur H2 sur la lysine 27 au niveau du

promoteur du gène) au niveau du gène du BDNF, ce qui réduirait les protéines endogènes et leur fonction (Modarresi et al., 2012).

Le BDNF est d’abord synthétisé comme pro-polypeptide, et devra subir un clivage protéolytique pour donner la protéine BDNF mature. Dans la région pro du BDNF réside **un polymorphisme fonctionnel** d’un seul acide aminé au niveau du codon 66 : une valine est substituée par une méthionine (Val66Met). Une réduction générale de la plasticité synaptique est alors observée (Antal et al., 2010), ainsi qu’une réduction du volume de l’hippocampe (Pezawas et al., 2004) et des altérations de la mémoire épisodique (Egan et al., 2003). Une étude a montré que la fréquence de l’allèle Met variait de 0 à 72% selon la population étudiée : par exemple, la fréquence de cet allèle est nulle dans la population Africaine Subsaharienne (Petryshen et al., 2010).

Chez le rongeur, le gène du BDNF, exprimé sur le chromosome 3 chez le rat et sur le chromosome 2 chez la souris, consiste en **8 exons 5’ non codants** (exon I à exon VIII) et **un exon 3’ codant pour la séquence en acide aminé proBDNF** (exon IX) (figure 11B). Chaque jonction intron-exon contient un site donneur et un site accepteur d’épissage : la transcription du gène résulte donc en un transcrite contenant un des 8 exons 5’ et l’exon codant. Comme chez l’homme, au sein de l’exon II, il existe également des sites d’épissages donneurs alternatifs (notés A, B et C dans la figure 11), ce qui peut former 3 transcrits d’exons II différents (Aid et al., 2007).

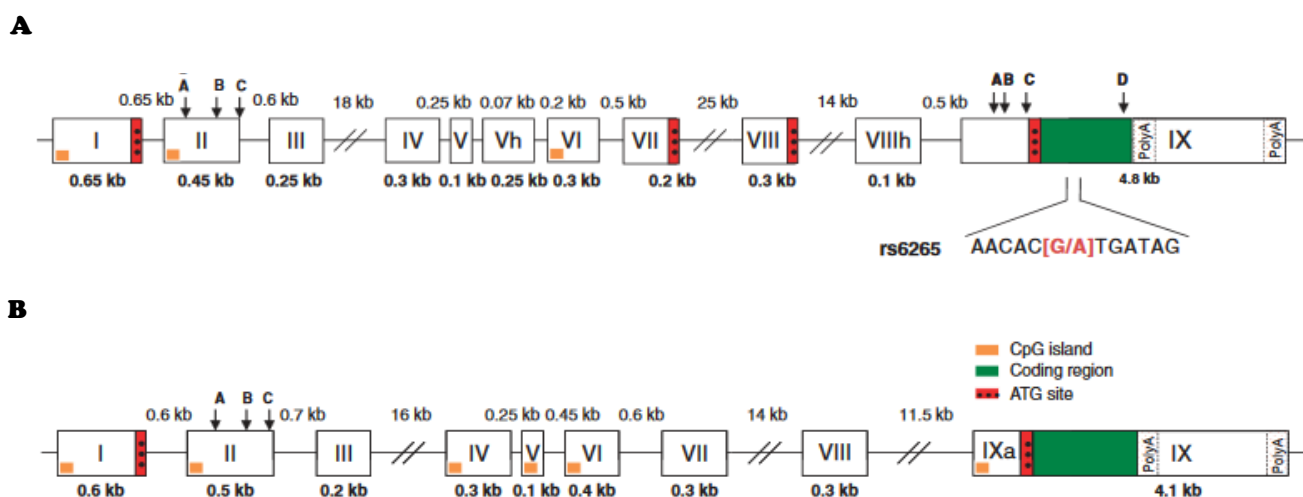


Figure 11 : Structure du gène du BDNF chez l’homme (A) et chez le rongeur (B)

Les lignes représentent les introns et les rectangles blancs les exons. L’exon IX codant, représenté par la partie verte, contient 2 sites de polyadénylation (polyA). Les rectangles rouges représentent le codon ATG d’initiation de la transcription. Le polymorphisme dans la région du proBDNF est également représenté. Les exons II et IX contiennent des sites donneurs d’épissages alternatifs, représentés par les flèches, et notés A, B, C ou D. D’après Aid et al., 2007; Boulle et al., 2012; Pruunsild et al., 2007.

Ces variants aux extrémités 3' et/ou 5' différentes permettent une régulation spatiale du BDNF. Cela dépend en partie des promoteurs du gène (Timmusk and Metsis, 1994; Timmusk et al., 1993), qui vont être sollicités en réponse à divers stimuli. Par exemple, le promoteur de l'exon IV contient 3 éléments sensibles au calcium nommés CaRE1, CaRE2 et CaRE3 (Zheng et al., 2011, 2012). C'est le facteur CREB qui se lie à CaRE3. La transcription du gène va dépendre de l'activité neuronale et de la concentration intracellulaire en calcium.

Comme chez l'homme, via ses 2 sites de polyadénylation, le transcrit primaire de BDNF donnera 2 populations d'ARN messenger de BDNF possédant soit la forme 3' UTR courte soit la forme 3' UTR (Untranslated Transcribed Region) longue. La forme courte des ARN messagers du BDNF a été montrée comme étant restreinte au soma des neurones; son rôle étant de maintenir une production basale de BDNF (An et al., 2008; Lau et al., 2010). Depuis, une étude récente montre que les transcrits courts et longs peuvent être adressés au niveau des dendrites et y être traduits localement. C'est l'interaction avec certaines protéines de liaison à l'ARN, nommées RBP (RNA Binding Protein) qui régule l'adressage des transcrits aux dendrites en réponse à différents stimuli. Par exemple, l'interaction avec CPEB-1, une RBP, permet au transcrit court d'être adressé aux dendrites, un adressage qui nécessite aussi l'interaction avec d'autres RBP tel que ELAV-2 et -4 (Vicario et al., 2015).

Il existe aussi des **régulations épigénétiques** de la transcription du gène, qui ont fait l'objet de nombreuses études ces dernières années car ces modifications ont été liées avec les maladies psychiatriques (Mitchelmore and Gede, 2014). Des méthylations sur les résidus cytosines des dinucléotides CpG au niveau du promoteur IV du BDNF peuvent avoir lieu, ce qui peut, via l'activité neuronale, entraîner la transcription du gène. Par exemple, en se liant à des cytosines méthylées, le facteur MeCP2 (methyl-CpG-binding protein 2) recrute des histones deacetylases pour réguler la transcription.

La régulation du gène est donc très complexe : en fonction du contexte, de la région étudiée, et de la localisation subcellulaire, différents transcrits de la protéine BDNF sont finement régulés.

DU PROBDNF VERS LE BDNF MATURE

Synthèse et stockage intracellulaire

Le preproBDNF est **synthétisé dans le réticulum endoplasmique**, et il est transporté dans des vésicules (Rothman and Orci, 1992), après clivage du signal peptide dans le réseau trans-Golgien (Greenberg et al., 2009). Il a été suggéré qu'il puisse se former des homodimères, ou des hétéromères de proneurotrophines dans le réticulum endoplasmique (Heymach and Shooter, 1995; Kolbeck et al., 1994). Le proBDNF est un précurseur de 32 kDa qui est N-glycosylé et glycosulfaté dans le site du proBDNF (Mowla et al., 2001).

À partir du réseau trans-golgien, 2 types de vésicules peuvent être générées selon leur mécanisme de sécrétion (Merighi, 2002). Présentes dans tous les types cellulaires, les vésicules de sécrétion de la **voie constitutive** (d'un diamètre de 50 à 100 nm) vont être **transportées par défaut** vers la membrane plasmique et fusionner avec elle pour **libérer le BDNF dans l'espace extracellulaire de façon non régulée, continue**. Les autres granules de sécrétion (d'un diamètre de 100 à 300 nm), de la **voie régulée**, s'accumuleront à la membrane plasmique mais ne fusionneront que lorsqu'**un potentiel d'action** le leur permettra (Lessmann and Brigadski, 2009). Il peut s'agir de vésicules à corps dense, qui peuvent être transportées de façon bidirectionnelle vers l'axone ou les dendrites, par un mécanisme dépendant d'une protéine se liant aux microtubules : la dynactine (Kwinter et al., 2009).

Dans ce cas, l'exocytose requiert du calcium, et se fait généralement à des endroits où la membrane plasmique est riche en cholestérol (Lang et al., 2001). C'est vers cette voie que le BDNF est majoritairement adressé (Mowla et al., 1999). Il a été montré qu'une partie du BDNF mature (des résidus acides en particulier) interagissait avec la carboxypeptidase E, CPE (deux résidus basiques), qui agit comme un récepteur, ce qui permet d'adresser la protéine dans les vésicules de la voie régulée (Lou et al., 2005; Park et al., 2008; Thomas and Davies, 2005). Sans CPE, le BDNF est plutôt adressé vers la voie de sécrétion constitutive (Lu et al., 2005). D'un point de vue morphologique, des souris KO pour la carboxypeptidase E démontrent une arborisation dendritique corticale et hippocampique différente par rapport aux souris contrôles, ainsi que des différences dans la taille des dendrites (Woronowicz et al., 2010).

Enfin, une partie du proBDNF a été montrée comme interagissant avec la queue cytoplasmique de la sortiline, une autre protéine intracellulaire chaperonne agissant comme un récepteur. Ceci permet un adressage du proBDNF aux vésicules de sécrétion de la voie régulée dans les neurones (Chen et al., 2005; Lu et al., 2005). Le fait d'avoir le polymorphisme Val66Met empêche l'interaction entre le proBDNF et la sortiline, il en résulte un mauvais adressage du proBDNF dans les vésicules de sécrétion, et donc des fonctions cognitives altérées comme une moins bonne mémoire épisodique.

Le clivage

Le proBDNF a plusieurs devenir : il peut être clivé en BDNF mature au niveau intracellulaire puis sécrété ; il peut être sécrété directement sous sa forme proBDNF et être clivé au niveau extracellulaire, enfin, il peut être sécrété sans être clivé. Le **clivage du fragment N-terminal** par des protéases spécifiques générera la **protéine mature** d'un poids moléculaire d'environ 14 kDa. La littérature décrit également une forme de BDNF à 28 kDa qui n'est pas nécessairement obligatoire à la formation du BDNF mature (Mowla et al., 2001).

CLIVAGE INTRACELLULAIRE ET STOCKAGE

Le proBDNF peut être clivé en BDNF mature au niveau intracellulaire par des endoprotéases comme la **furine dans le trans-Golgi**. Dans les axones pré-synaptiques, le proBDNF et le BDNF mature sont colocalisés dans des vésicules de sécrétion, ce qui suggère que le clivage peut aussi intervenir dans les **granules de sécrétion**. Le proBDNF peut y être clivé par des **prohormones convertases** (Dieni et al., 2012; Seidah et al., 1996).

CLIVAGE EXTRACELLULAIRE

Libéré dans l'espace synaptique, le proBDNF peut y être clivé par des métalloprotéases de la matrice extracellulaire, ou bien par l'enzyme plasminogène, activée par l'activateur de plasminogène tissulaire, le tPA (tissue plasminogen activator) (Gray and Ellis, 2008; Keifer et al., 2009; Lee et al., 2001). Ce clivage extracellulaire est rapporté comme étant le phénomène le plus important parmi les autres phénomènes de conversion (Nagappan et al., 2009). Le tPA est une sérine protéase de 70 kDa, qui catalyse la conversion du plasminogène en plasmine, une protéase capable de dégrader de

nombreux substrats. A l'origine, le tPA a été caractérisé comme permettant la fibrinolyse dans le compartiment vasculaire. Sa présence ne se limite pas à ce compartiment puisqu'il a été observé dans les neurones et la microglie, mais pas dans les oligodendrocytes et les astrocytes. Il est stocké dans des vésicules de sécrétion et libéré dans l'espace extracellulaire lors d'une dépolarisation membranaire ou d'une stimulation.

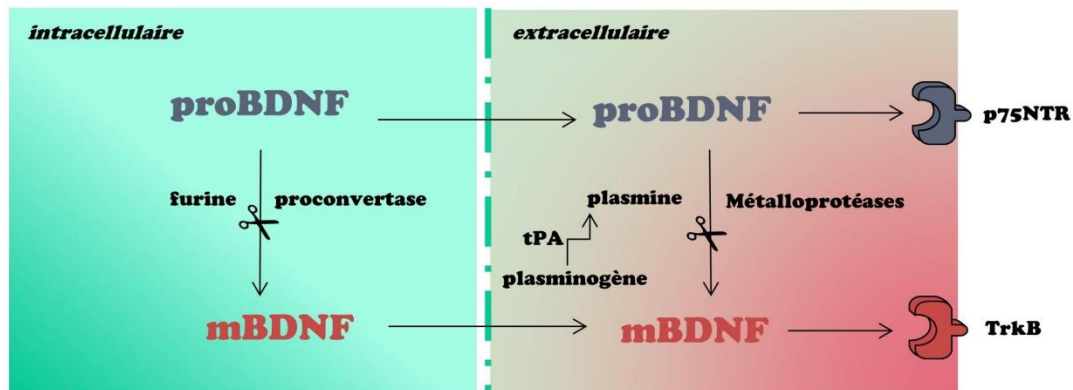


Figure 12: Résumé du clivage protéolytique du proBDNF neuronal

Adapté d'après Khan and Smith, 2015

Rôles du tPA

En conditions physiologiques, le tPA est impliqué dans la migration neuronale et la croissance synaptique lors du développement, alors que chez l'adulte, le tPA joue un rôle dans la neurotransmission et la plasticité synaptique. Par exemple, une inhibition de la phase tardive de la LTP a été montrée via l'utilisation d'inhibiteur du tPA dans les fibres moussues de l'hippocampe (pour revue, voir (Baranes et al., 1998; Melchor and Strickland, 2005). Le stress chronique chez la souris provoque des modifications moléculaires (diminution des sous-unités NR1 et NR2 des récepteurs NMDA) et morphologiques (plasticité des épines dendritiques) dans l'hippocampe ainsi que des altérations comportementales (perturbation de la mémoire spatiale) et ce via des effets protéolytiques ou non protéolytiques du tPA (Pawlak et al., 2005).

Récemment par exemple, une équipe a montré que des injections de rt-PA (par voie i.v.) (recombinant tissue plasminogen activator ou activateur tissulaire du plasminogène recombinant) chez le rat provoquaient une augmentation progressive du BDNF mature spécifiquement dans l'hippocampe parallèlement à une activation du récepteur TrkB. Dans cette étude, les auteurs démontrent que le phénomène est indépendant de l'activité plasmine, mais est plutôt lié à une activation des récepteurs NMDA (Rodier et al., 2014). En effet, il semble que l'activation des

récepteurs NMDA permette la libération de tPA des neurones vers l'espace extracellulaire. Dans cette étude, les auteurs démontrent l'interaction du tPA (via son site catalytique) avec la sous unité NR1 des récepteurs NMDA. Le tPA entraîne le clivage de NR1 dans sa partie terminale. En augmentant de 37% l'influx calcique des récepteurs NMDA, le tPA potentialise les phénomènes d'excitotoxicité, conséquences de l'activation massive des récepteurs NMDA (Nicole et al., 2001). En outre, aucune différence n'est relevée dans le taux de proBDNF, il est donc possible que le rt-PA participe à la fois à la maturation du BDNF et à sa synthèse continue (Rodier et al., 2014).

Enfin, il a été montré que la libération de dopamine dans le Nac après une faible dépolarisation membranaire (40 mM KCl) était potentialisée par le tPA (Ito et al., 2006).

Lien tPA et dépendance

En 2004, l'équipe de Nagai a montré **qu'une seule injection de morphine** (10mg/kg, *s.c*) augmentait de 772% les ARNm de tPA dans le Nac par rapport à des animaux témoins. Bien que ce pourcentage ne soit pas si élevé lors d'injections chroniques (5 jours de traitement avec des doses croissantes de morphine), des augmentations de 150 % dans cette même région ont tout de même été rapportées. Les niveaux protéiques et l'activité enzymatique du tPA étaient également augmentés de façon significative (Nagai et al., 2004a). Il semble que le système tPA-plasmine joue un rôle important dans les effets récompensant de la morphine, puisque la préférence de place à la morphine était soit réduite chez des souris KO pour le tPA, soit absente chez des souris KO pour le plasminogène. Enfin, dans ces mêmes expériences, il a été montré que le tPA était nécessaire pour induire la libération de dopamine dans le Nac après une injection de morphine.

Il semble également que le stress impacte le taux de tPA dans l'amygdale : les souris déficientes pour le tPA ont ainsi des réponses anormales face au stress et des taux anormaux de corticostérone circulants pendant la période de récupération après le stress. Récemment, une équipe a montré que l'activation des récepteurs aux glucocorticoïdes par le **stress** améliorait la mémoire contextuelle de peur par un **mécanisme indirect BDNF-dépendant**. En effet, dans cette étude les glucocorticoïdes augmentent les taux de proBDNF et de tPA. La plasmine générée participe au clivage du proBDNF en BDNF mature, et ce dernier induit une cascade de signalisation conduisant à la phosphorylation de ERK (Revest et al., 2014).

Le transport

La présence de BDNF endogène au niveau axonal et dendritique a été rapportée. Le transport antérograde du BDNF, du soma vers la terminaison axonale a été proposé comme étant la source principale de libération de BDNF (Adachi et al., 2005). Un peu plus tard, Lessmann et Brigadski ont émis l'hypothèse que l'adressage du BDNF dans la cellule était lié à sa quantité : des faibles taux de BDNF sont plus en faveur d'un adressage de la protéine aux dendrites, tandis que des taux plus élevés favorisent, en plus d'un adressage aux dendrites, un transport antérograde axonal (Lessmann and Brigadski, 2009).

La sécrétion

Il a été montré que le BDNF pouvait être **sécrété** à partir de structures **pré- et post-synaptiques** (Edelmann et al., 2014). En effet, il peut être sécrété au niveau axonal ou dendritique. Les vésicules à corps dense sont observées au niveau des axones, tandis que les vésicules sans corps dense sont situées au niveau dendritique (Dean et al., 2012; Park and Poo, 2013). Les taux endogènes intra- et extra-cellulaires de BDNF sont faibles, la **libération et l'action du BDNF** est donc **locale**. Matsuda et ses collaborateurs ont montré différentes modalités de fusion des vésicules de sécrétion contenant le BDNF, selon si la libération est axonale ou dendritique dans une culture de neurones provenant de l'hippocampe. Lors d'une stimulation électrique tonique, une fusion complète des vésicules avec une forte sécrétion de BDNF est observée au niveau dendritique. Le BDNF peut alors agir au niveau des terminaisons pré-synaptiques en tant que signal rétrograde, ou au niveau post-synaptique, en tant que facteur autocrine. Au niveau axonal en revanche, une fusion incomplète des vésicules (et donc une libération de BDNF faible) est observée au niveau de l'axone. C'est lorsque la stimulation est prolongée, dans un protocole de stimulation à haute fréquence, que la sécrétion totale de BDNF axonale est observée (Matsuda et al., 2009). De plus, après un protocole de stimulation tétnique à haute fréquence, une libération post-synaptique de BDNF a été reportée au niveau de synapses glutamatergiques de neurones de l'hippocampe de rat en culture. Il s'agit d'un processus dépendant d'un influx calcique post-synaptique (Hartmann et al., 2012). Ce dernier peut provenir de différentes sources : les récepteurs-canaux NMDA, les canaux calciques voltages-dépendants (VDCC), ou encore

les stocks intracellulaires de calcium (Kuczewski et al., 2009) . D’un point de vue moléculaire, il a été récemment montré que la protéine cytosolique nommée CAPS1 participait à la fusion des vésicules de sécrétion contenant le BDNF dans des neurones de l’hippocampe de souris en culture (Eckenstaler et al., 2016).

Les récepteurs du BDNF

LE RÉCEPTEUR    ACTIVITÉ TYROSINE KINASE TRKB

Le BDNF mature et le proBDNF exercent des fonctions opposées : on parle d’une action « yin-yang » des neurotrophines. Dans sa forme immature, le **proBDNF** peut se lier avec une forte affinité au récepteur **p75**, un facteur de nécrose tumorale. Ceci entraine une cascade de signalisation dont la conséquence est la mort cellulaire (Lu et al., 2005). Au cours de ces travaux de thèse, c’est l’action du BDNF mature qui a été source d’intérêt, aussi, la signalisation du proBDNF ne sera pas détaillée ici.

Les neurotrophines matures (dont NT-3, NT-4, NT-5 et NT-7), le NGF, et le BDNF partagent une **affinité commune pour le récepteur p75**, mais il s’agit d’une affinité faible ($k_D = 10^{-9}$ M). En revanche, chaque neurotrophine a sa **propre affinité** ($k_D = 10^{-11}$ M) parmi la famille des **récepteurs à activité tyrosine kinase** (TrkA, TrkB et TrkC) (McKay et al., 1996). Ces récepteurs, et notamment le produit du gène TrkA (appelé initialement Trk), ont été identifiés pour la première fois à partir d’une biopsie de carcinome du colon comme étant des gènes transformants, c’est-à-dire des gènes capables, par l’intermédiaire d’une modification, d’induire un phénotype cancéreux (Martin-Zanca et al., 1989).

Le **BDNF mature** se lie au **récepteur TrkB**. Il existe 8 transcrits différents pour le récepteur TrkB, qui vont coder pour 2 classes de récepteurs : **une forme « entière », TrkB^{TK+}**, très glycosylée, composée de 821 acides aminés et une seconde classe, **TrkB^{TK-}**, identique à la première, à la différence qu’elle ne possède qu’un petit domaine cytoplasmique (de l’ordre d’une vingtaine d’acide aminés), et est donc **dépourvu de domaine catalytique**. Ces récepteurs ne peuvent donc pas être autophosphoryl  s. Plusieurs isoformes tronquées dans la partie C-terminale sont décrites dans la littérature : il s’agit des formes TrkB.T1, TrkB.T2. Ces isoformes contiennent des séquences uniques en acides aminés dans leur partie terminale. Chez l’homme, une autre isoforme a été identifiée et semble être exprimée principalement dans le cerveau : il s’agit de l’isoforme TrkB.Shc, qui possède le site de liaison pour la protéine Shc dans le domaine juxtamembranaire, mais n’a pas de domaine à activité tyrosine kinase.

Une étude a montré qu’une exposition courte au BDNF (15 secondes) augmentait rapidement l’expression des récepteurs TrkB en surface, mais lorsque l’exposition au BDNF était prolongée (de 1 à 24 heures), l’expression des récepteurs en surface diminue drastiquement (Haapasalo et al., 2002).

COMPOSITION

Les récepteurs à activité tyrosine kinase sont distribués à la membrane plasmique, et leur partie N-terminale est localisée au niveau extracellulaire. La partie extracellulaire du récepteur est composée de 3 régions riches en résidus leucines encadrées par 2 domaines cystéines et 2 domaines qui présentent une analogie de structure avec les immunoglobulines (Huang and Reichardt, 2003). Deux sites de la partie extracellulaire du récepteur ont été identifiés comme pouvant lier indépendamment le BDNF : un tiers du site riche en leucine avec le domaine riche en cystéine C2 (figure 13), et la partie immunoglobuline 2 (Haniu et al., 1997). Le récepteur possède ensuite un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique    activité tyrosine kinase. La partie intracellulaire comporte également des tyrosines en dehors du domaine kinase qui peuvent également être phosphorylées et entraîner des cascades de signalisation particulières. Une étude a montré par 3 techniques différentes que le récepteur TrkB se dim  risait spontanément dans le réticulum endoplasmique avant d’atteindre la surface membranaire dans une culture de cellules HEK. Le domaine cytoplasmique du récepteur jouerait un rôle important dans la dimérisation. Le récepteur ne devient cependant actif que lors de l’incubation avec le BDNF dans le milieu (Shen and Maruyama, 2012).

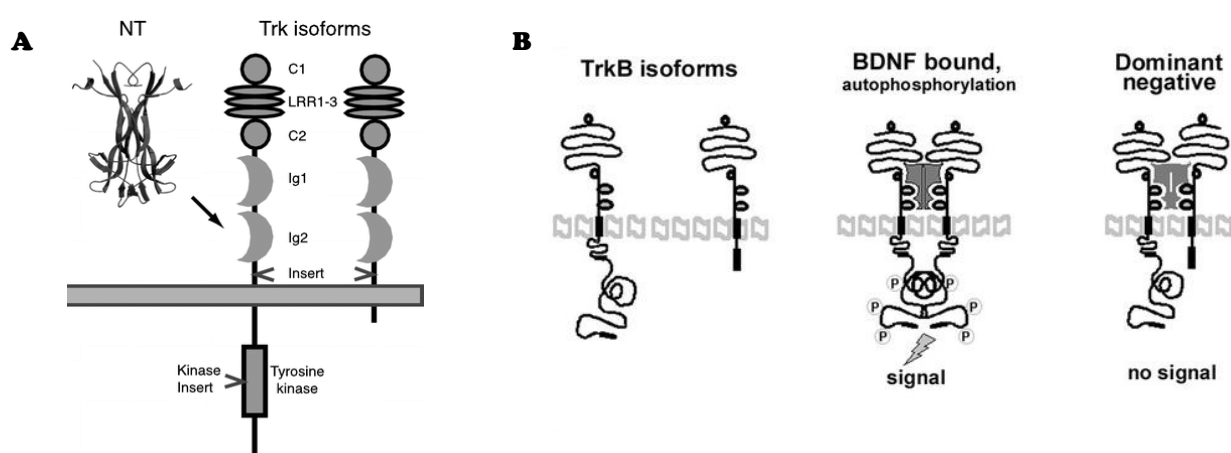


Figure 13 : Les récepteurs à activité tyrosine kinase Trk

A : Composition des isoformes du récepteur Trk, NT : neurotrophine, C : domaine riche en cystéines, LRR : motif leucine répété, Ig : domaine immunoglobuline d’après Huang and Reichardt, 2003. B : Activation des récepteurs TrkB, d’après Saarelainen et al., 2003.

LOCALISATION

Le récepteur TrkB est distribué de façon ubiquitaire, on le retrouve dans le SNC, en quantité importante dans l'hippocampe, le cervelet et la moelle épinière, mais également au niveau du système nerveux périphérique. Il est également exprimé dans des structures non neuronales, comme la langue, le colon, l'intestin, ou encore le pancréas (Muragaki et al., 1995; Shibayama and Koizumi, 1996). Certaines études ont montré que le récepteur $\text{TrkB}^{\text{TK+}}$ était plutôt neuronal alors que les 2 autres isoformes $\text{TrkB}^{\text{TK-}}$ sont plutôt localisées au niveau des oligodendrocytes ou des astrocytes (Fryer et al., 1996; Shibayama and Koizumi, 1996). Dans les neurones, le récepteur TrkB est exprimé au niveau pré et post-synaptique (OHIRA and Hayashi, 2009).

MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES

Selon les espèces, il y aurait 9 sites de N-glycosylation communs aux récepteurs TrkA, B et C dans le domaine extracellulaire. Seules 4 asparagines, l'acide aminé liant l'oligoside, auraient un emplacement conservé chez toutes les espèces, et concerneraient précisément les asparagines 26, 90, 17 et 223 (Haniu et al., 1995 ; Watson et al., 1999). Une étude fonctionnelle du récepteur TrkA a montré qu'une forme partiellement glycosylée du récepteur, observable à 110 kDa en western blot, n'était pas localisée à la membrane plasmique, mais plutôt retenue dans le réticulum endoplasmique (Miranda et al., 2002). Cette forme non glycosylée peut être phosphorylée de manière constitutive, en l'absence de neurotrophine, à la fois au niveau du domaine catalytique mais aussi au niveau d'autres tyrosines dans le domaine juxtamembranaire dans les cellules PC12. Cependant, ces phosphorylations n'entraînent pas d'activation des kinases MEK et ERK, normalement activées après fixation du ligand sur le récepteur (Watson et al., 1999).

Cascades de signalisation intracellulaire

Une fois le ligand fixé au récepteur, ce dernier se **dimérise** et subit une **autophosphorylation** sur plusieurs résidus tyrosine dans le domaine à activité tyrosine kinase, pour induire un **changement conformationnel permettant aux sites actifs d'être plus accessibles au substrat** (figure 14). Si trois résidus tyrosines sont dans le domaine catalytique (Y670, Y674 et Y675), d'autres tyrosines peuvent être transphosphorylées en dehors du domaine à activité kinase (Huang and Reichardt, 2003; Middlemas et al., 1994).

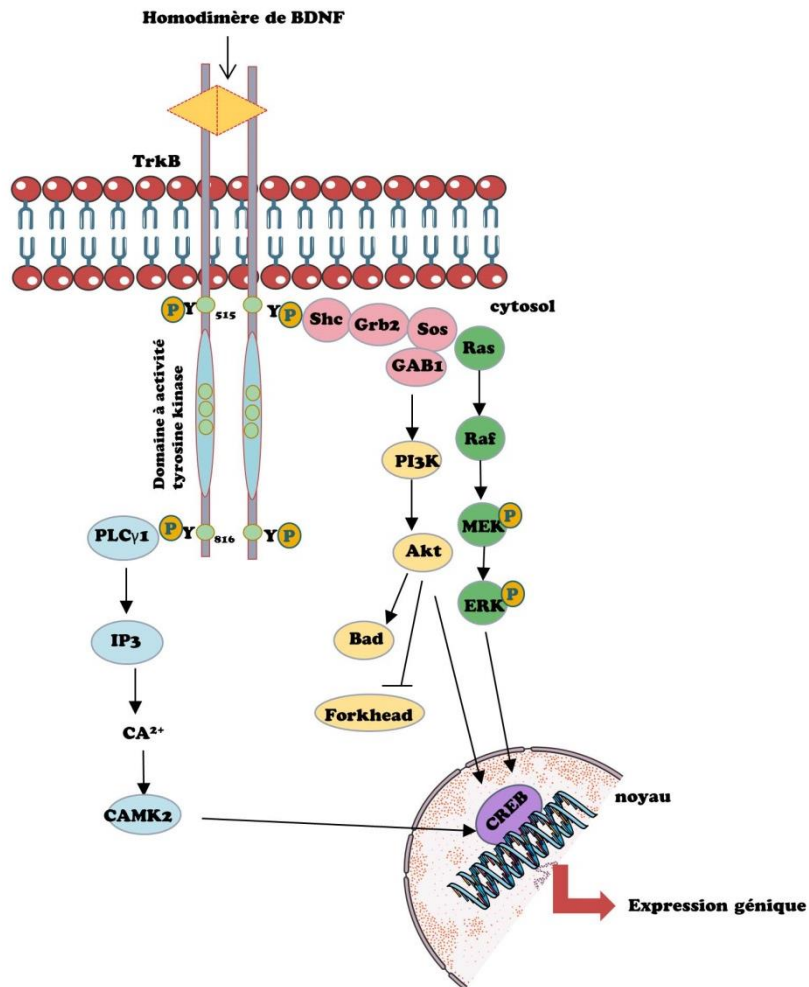


Figure 14: Représentation simplifiée de la cascade de signalisation BDNF- TrkB

Adaptée et modifiée d'après Blum and Konnerth, 2005; Cunha et al., 2010. Le BDNF se lie au récepteur TrkB, permettant ainsi sa dimérisation et son autophosphorylation sur les résidus tyrosines dans le domaine cytoplasmique du récepteur. Cela va permettre l'activation de 3 cascades de signalisation principales : PLC γ , PI3K et ERK, qui mènent à la phosphorylation et à l'activation du facteur de transcription CREB, permettant la transcription de gènes essentiels à la survie et à la différenciation neuronale. PLC γ : phospholipase C; IP $_3$: inositol triphosphate, CamK2 : calcium/calmodulin dependent protein kinase II; PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase; ERK : extracellular signal-regulated kinase; Shc : src homology domain containing; Grb2 : growth factor receptor-bound protein 2; SOS : son of sevenless; Gab1 : Grb-associated binder 1; CREB : cAMP-calcium response element binding protein; Ras : GTP binding protein; Raf : Ras associated factor; MEK : MAP/Erk kinase, Bad : Bcl2 – antagonist of cell death.

La phosphorylation des tyrosines sert à accueillir des effecteurs cytoplasmiques, qui vont activer différentes voies de signalisation. Ceci amènera un changement de l'expression de gènes et différentes réponses biologiques dans les neurones. Il a été montré que la phosphorylation des différents résidus tyrosine ne s'effectue pas de façon synchronisée : par exemple après application de NGF sur des cellules PC12 surexprimant le récepteur TrkA, la tyrosine Y674 est phosphorylée avant la tyrosine 515. Par ailleurs, la phosphorylation sur la tyrosine 515 est plus persistante que sur la tyrosine 674 (Segal et al., 1996).

La **transphosphorylation de la tyrosine 490**, dans le domaine juxtamembranaire, interagit avec la protéine adaptatrice Shc. Cette protéine va former un complexe protéique avec Grb2 (Growth factor Receptor Bound protein 2) et Sos (Son of sevenless). La protéine Sos est un facteur d'échange qui va **activer la petite protéine G Ras**. Ras se lie ensuite à d'autres kinases de la famille Raf, ce qui conduit à **l'activation de MEK (MAPK kinase) et ERK**. La protéine ERK phosphorylée peut être transloquée dans le noyau afin **d'activer des facteurs de transcription**. Cette cascade de signalisation induit la survie des cellules **en stimulant l'activité ou l'expression de protéines anti-apoptotiques**, comme Bcl-2 et le facteur de transcription CREB. Parallèlement, la protéine Grb2 peut également recruter une autre protéine intermédiaire, **Gab1**, afin **d'activer la voie des PI3 kinase** (phosphoinositide 2-kinase), qui stimulera la sérine/thréonine kinase Akt (appelée aussi protéine kinase B). La protéine Akt possède bon nombre de substrats, parmi lesquels Bad, un inhibiteur de BCL-2 impliqué dans la régulation positive de l'apoptose mitochondriale, ou encore Forkhead, un facteur de transcription induisant l'apoptose. Une étude sur culture cellulaire a également montré qu'Akt était capable de phosphoryler CREB (Du and Montminy, 1998).

Ainsi, Akt **supprime l'apoptose** en phosphorylant les protéines apoptotiques. Il a également été montré que Ras interagissait directement avec la PI3K. L'activation de cette dernière est donc certainement la conséquence de l'action de Ras et Gab1. La voie Akt-PI3K favorise donc **la survie neuronale** (pour revue voir (Cunha et al., 2010; Kaplan and Miller, 2000; Minichiello, 2009).

La **transphosphorylation de la tyrosine 816** permet le recrutement de la phospholipase C gamma **PLC γ** . Ceci va permettre une **augmentation de la concentration calcique** via une libération des stocks intracellulaires et l'activation de la **CAMKII** (Ca²⁺-calmodulin dependent kinase). Cette dernière peut également **activer le facteur de transcription CREB**, ce qui va participer à l'expression du BDNF lui-même.

Des **trans-activations du récepteur Trk** ont été mises en évidence *in vitro* et *in vivo* par un mécanisme indépendant des neurotrophines. Ces transactivations décrites sont liées soit aux antidépresseurs, ou encore sont dépendantes de ligands de récepteurs couplés aux protéines G, comme l'adénosine ou le polypeptide PACAP (Lee and Chao, 2001; Rajagopal et al., 2004; Rantamäki et al., 2011).

Enfin, les **isoformes du récepteur** peuvent lier le BDNF et l'internaliser. Une étude suggère qu'en réponse à une exposition au BDNF, les cellules augmenteraient leur niveau protéique de TrkB-Shc : il s'agirait d'un mécanisme limitant l'activation des récepteurs non tronqués (par exemple en formant des hétérodimères), et limitant la diffusion du BDNF (Fenner, 2012; Wong and Garner, 2012).

Les isoformes agiraient donc comme **dominants négatifs** de la signalisation BDNF-TrkB. En 2002, Offenhäuser et ses collaborateurs montraient que la liaison du BDNF au récepteur TrkB.T1 n'engendrait pas de modification de l'expression des gènes dans des cellules NIH-3T3 en culture (Offenhäuser et al., 2002). Quelques années plus tard, les recherches sont allées au-delà du rôle de dominant négatif du récepteur et il a été montré que le récepteur TrkB.T1 était impliqué dans diverses autres fonctions, dépendantes ou indépendantes du BDNF. Les cellules non neuronales exprimant TrkB.T1 peuvent par exemple réguler le taux extracellulaire de BDNF en le séquestrant et en le stockant dans des vésicules. Lorsque le BDNF vient à manquer, le BDNF peut alors être libéré par exocytose. D'autres hypothèses proposent que TrkB.T1 soit lié à la protéine inhibitrice de dissociation du GDP, RhoGDI. L'activité des RhoGTPases régulerait ensuite la stabilité et la morphologie des cellules gliales. En présence de BDNF, il y aurait une dissociation de TrkB.T1 et RhoGDI, afin d'inhiber les RhoGTPases, provoquant plutôt une déstabilisation du cytosquelette (Fenner, 2012). Enfin, au niveau des astrocytes, des concentrations subnanomolaires de BDNF provoquent l'activation d'une protéine G et de la PLC γ , puis la libération massive de calcium du réticulum endoplasmique, un mécanisme qui va favoriser l'activité neuronale (Rose et al., 2003).

Le devenir du complexe BDNF-TrkB

Si l'internalisation peut représenter une extinction du signal pour la plupart des facteurs de croissance, dans le cas du récepteur TrkB activé, il s'agit d'une étape importante permettant certaines fonctions biologiques des neurotrophines. Même si elles peuvent exercer une action synaptique locale, la signalisation des neurotrophines des axones vers le corps cellulaire est déterminante pour la croissance des dendrites et la survie neuronale. Ainsi, un **transport rétrograde** du complexe BDNF-TrkB est donc nécessaire (Huang and Reichardt, 2003). Récemment, une étude a montré le devenir du BDNF après activation des récepteurs, en liant le BDNF avec des nanoparticules fluorescentes photostables. Cinq minutes après l'application de 200 pM de BDNF dans une culture embryonnaire de ganglions noueux, le complexe BDNF-TrkB est proche de la membrane plasmique alors que 60 minutes après la mise en présence du BDNF, 90% des complexes BDNF-TrkB se trouvent au niveau du soma des neurones. Dans le soma, le trafic du BDNF est très hétérogène, et aucun mouvement ne semble particulièrement dédié à une localisation subcellulaire précise (Vermehren-Schmaedick et al., 2014).

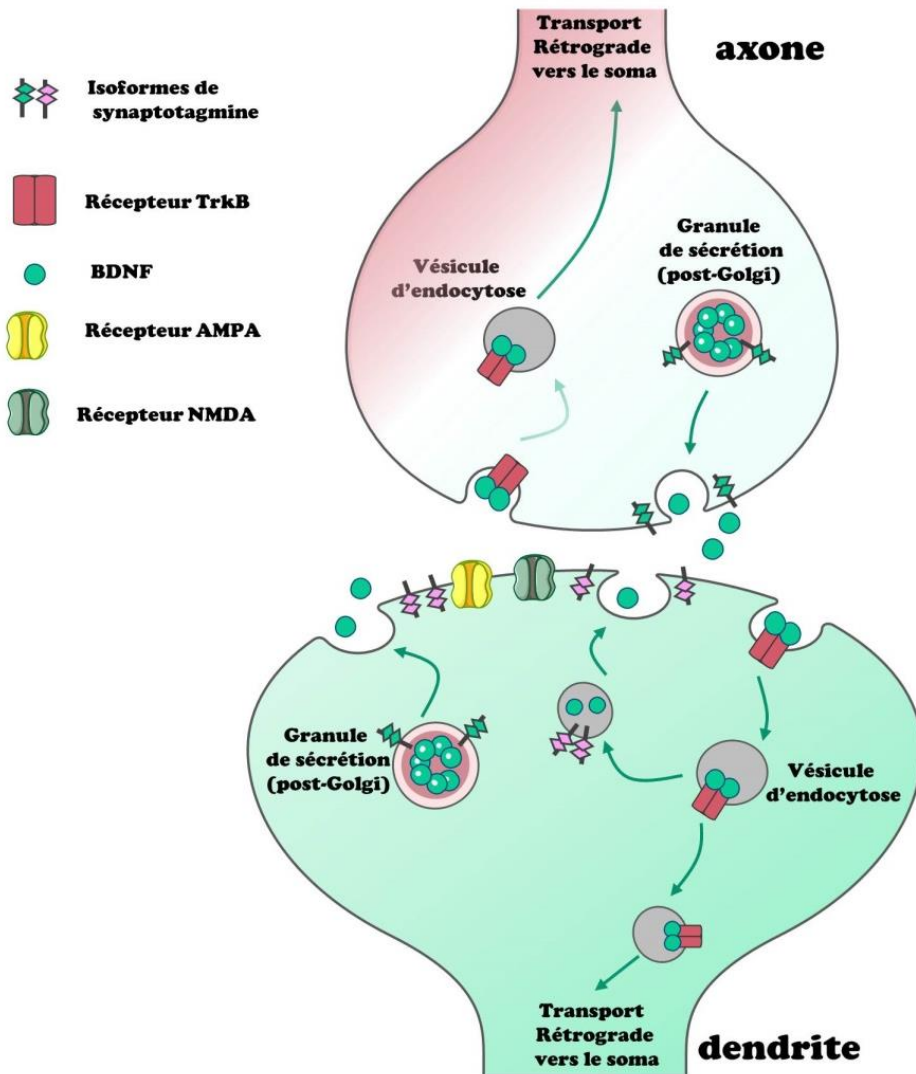


Figure 15: Sécrétion, recapture et transport du BDNF au niveau synaptique

La liaison du BDNF sécrété avec le récepteur TrkB conduit à l'endocytose du complexe dans des endosomes de signalisation par le neurone pré- ou post-synaptique. Il peut se produire une libération du BDNF contenu dans les granules de sécrétion, ou encore à partir des endosomes contenant le BDNF internalisé, un processus dépendant des récepteurs AMPA et NMDA. Selon l'origine du BDNF, différentes isoformes de synaptotagmine participent à la libération du BDNF. Au niveau post-synaptique des dendrites ceci permet une réutilisation du BDNF tandis que le BDNF axonal contenu dans les endosomes au niveau pré-synaptique peut être transporté vers le soma et les dendrites du neurone pré-synaptique. Adapté d'après Wong et al., 2015.

Le complexe BDNF-TrkB est internalisé dans des **endosomes de signalisation** ne contenant pas nécessairement de la clathrine. Il a été montré que le domaine riche en leucine de la protéine transmembranaire Slitrk5 interagissait avec le domaine riche en leucine du récepteur TrkB, permettant, en présence de BDNF, de favoriser le recyclage du complexe BDNF-TrkB, dans des endosomes contenant la protéine Rab11 (Song et al., 2015). Cette internalisation **requiert un influx calcique**, provenant soit de canaux calciques dépendants du voltage, soit de récepteurs NMDA. Le récepteur Trk reste phosphorylé dans ces endosomes qui contiennent les molécules intermédiaires

PLASTICITÉ SYNAPTIQUE

La capacité du cerveau à s'adapter ou à modifier son comportement en réponse à l'expérience ou à un environnement spécifique dépend de la plasticité des connexions synaptiques. Le BDNF joue un rôle majeur dans ces phénomènes (Cowansage et al., 2010). La **plasticité synaptique** est dite **ciblée** dans le sens où des modifications engendrées sur une synapse ne seront pas répercutées sur les autres synapses environnantes. Sécrété en réponse à l'activité neuronale et possédant une faible capacité de diffusion, le BDNF agit localement, au niveau des synapses actives. Il a été montré dans des neurones en culture que le BDNF participait à la **formation de nouvelles synapses** en permettant la dissociation des complexes cadherines- β caténines, des molécules d'adhésion cellulaires (Bamji et al., 2006). Pendant le développement, les jonctions neuromusculaires passent d'innervations multiples à des innervations simples via des compétitions entre les axones. Les **formes pro et mature** du BDNF constituent une balance dans **l'élimination ou le maintien des fibres nerveuses**. Le proBDNF des cellules musculaires post-synaptiques, via son récepteur p75 induit une rétraction des fibres nerveuses terminales, tandis que la conversion du proBDNF en BDNF mature retarde leur élimination (Je et al., 2013). Dans les neurones matures de l'hippocampe, le BDNF régule la densité et la morphologie des épines dendritiques (Kellner et al., 2014). Dans les dendrites apicales des neurones CA1, le BDNF augmente la densité des épines dendritiques par un mécanisme dépendant de ERK1/2 (Alonso et al., 2004)

PHASE PRÉCOCE DE LA POTENTIALISATION À LONG TERME

Parmi les phénomènes de plasticité synaptique, la LTP est très étudiée. Il s'agit de la potentialisation de l'efficacité de la transmission synaptique, indispensable aux phénomènes mnésiques. Elle se caractérise par une élévation de calcium au niveau post-synaptique, due à l'activation des récepteurs glutamatergiques NMDA. Elle peut être divisée en 2 phases : la phase précoce et la phase tardive. La phase précoce dure environ 1h et correspond à des transports de protéines existantes vers la synapse ou à des phosphorylations de protéines tandis que la phase tardive peut durer plusieurs heures et requiert une synthèse d'ARNm et de protéines *de novo*. Dans l'hippocampe adulte, l'inhibition de la signalisation BDNF-TrkB atténue l'expression de la phase précoce de la LTP. Les interventions génétiques touchant le gène exprimant le BDNF ou le récepteur TrkB chez les souris montrent des déficits de la LTP, un phénomène réversible par des applications exogènes de BDNF recombinant (Woo and Lu, 2009).

Régulation du BDNF dans l'addiction

Des altérations centrales et/ou périphériques de BDNF sont observées dans certaines pathologies telle que l'épilepsie, la dépression, la maladie d'Alzheimer ou encore la maladie de Parkinson. Dans ce chapitre, ce sont les altérations de BDNF reportées dans l'addiction qui seront spécifiquement détaillées.

Les études chez l'animal

Selon la drogue consommée, la durée et les doses des traitements, le temps de sevrage, la région d'intérêt ou encore la contingence de l'administration, les modifications de BDNF observées varient.

AUGMENTATION DES TAUX DE BDNF

Plusieurs études rapportent des **variations de BDNF dans le Nac**. Après un sevrage court et long à la méthamphétamine ou à la nicotine, une augmentation protéique de BDNF est rapportée. Au début du sevrage à la méthamphétamine, une augmentation de la forme phosphorylée de CREB (pCREB) est observée, ainsi qu'une augmentation plus tardive du ratio phosphoTrkB/TrkB (23 jours de sevrage) associé à une augmentation des épines dendritiques spécifiquement dans le Nac shell (Kivinummi et al., 2011; Ren et al., 2015).

Il semblerait qu'il y aient des **variations de BDNF spécifiques dans les sous-régions du Nac**, puisqu'avec la cocaïne, une augmentation des ARNm de BDNF est également reportée spécifiquement dans le shell, avec une diminution des récepteurs TrkB dans le core et dans le shell 5 jours après l'arrêt des traitements (Filip et al., 2006). Avec la cocaïne, les variations temporelles de BDNF suivant une injection ont été mesurées : les ARNm de BDNF augmentent dans le shell 60 minutes après l'injection de cocaïne (20mg/kg, i.p.), et déclinent après 90 minutes. Ensuite, 120 minutes après l'injection, ce sont les protéines de BDNF qui augmentent et restent élevées pendant 4 heures avant de retrouver un taux basal après 24 heures (Graham et al., 2007). Toujours après un traitement à la cocaïne, Huang et ses collaborateurs rapportent une augmentation progressive des protéines de BDNF dans le shell, 14 et 28 jours après l'arrêt du traitement, parallèlement à une

diminution de la prot     mGlu5, ce qui diminue la LTD d         des r         mGlu (Huang et al., 2011).

L'hippocampe, si     des apprentissages et de la plasticit     synaptique est aussi une r       d'int       pour observer les variations de BDNF : une        rapporte des alt         h         selon la sous-r       de l'hippocampe         . Une augmentation transitoire dans la r       CA1 de l'hippocampe dorsal est observ     2 heures apr     la derni     injection de nicotine avec un retour à l'     basal 24 heures apr     (Kenny et al., 2000). Quarante-huit heures apr     l'arr     d'un autre traitement à la nicotine, d'autres auteurs rapportent une augmentation des prot       de BDNF (Roni and Rahman, 2014). Il n'est pas impossible que les protocoles (administration forc     *versus* consommation volontaire dans l'eau de boisson) et la dur     des traitements (7 versus 21 jours) expliquent les diff         observ    .

Avec l'alcool, une        r       rapporte une augmentation de BDNF dans le cortex pr         de rats apr     12 jours de sevrage apr     gavage oral. Cette augmentation s'accompagne d'une          de l'interleukine 10, une cytokine anti-inflammatoire. Ceci pourrait contrebalancer les dommages caus     par l'intoxication à l'         et constituerait ainsi une r       adapt     pour restaurer l'hom         (Schunck et al., 2015). Enfin, avec la morphine, une augmentation des ARNm de BDNF est observ     24, 48 et 72 heures apr     la derni     injection de morphine dans le noyau paragigantocellularis qui constitue l'aff       majeure du locus coeruleus (Hatami et al., 2007).

DIMINUTION DE BDNF

Si au d       du sevrage, une augmentation des ARNm de BDNF est observ    , une diminution est rapport     à 7 jours de sevrage apr     implantation de pastilles de morphine sous-cutan    , ou apr     injections sous-cutan     dans le raph     dorsal (Lunden and Kirby, 2013). De la m        , 4 semaines apr     un protocole de 5 jours d'injections de morphine à doses croissantes, une diminution du BDNF est observ     dans l'hippocampe, un ph         qui est revers     par stimulation d'un point pr       d'acupuncture chez le rat (Lee et al., 2014). L'amygdale n'         pas non plus aux variations de BDNF et est une cible commune pour l'anxi     et l'alcoolisme : 24 heures apr     un traitement chronique à l'        , une r         de la signalisation du BDNF est observ    , avec une diminution de l'expression du g     pr       Arc, ainsi qu'une diminution de la densit     des        dendritiques. Ces ph         s'accompagnent d'un comportement anxiog     chez les animaux (Pandey et al., 2008). Enfin, dans l'ATV, l'expression du BDNF diminue apr     un traitement chronique à la morphine. Le BDNF dans l'ATV antagonise l'effet chronique de la morphine au niveau de la voie ATV-Nac. En

effet, des souris KO pour le BDNF spécifiquement dans l'ATV (stratégie par injection d'adénovirus) augmentent leurs scores de préférence de place à la morphine. Le BDNF influencerait l'excitabilité des neurones dopaminergiques projetant dans le Nac et en particulier les neurones porteurs des récepteurs dopaminergiques D1 (Koo et al., 2012).

RÉGULATIONS ÉPIGÉNÉTIQUES DU BDNF

Les régions promotrices du gène du BDNF sont la cible d'altérations épigénétiques et les drogues modulent ces phénomènes. Par exemple, après un protocole d'auto-administration de cocaïne, une augmentation protéique de BDNF ainsi qu'une augmentation de l'exon 1 est rapportée dans l'ATV après 7 jours d'abstinence forcée. Ce mécanisme impliquerait une augmentation de la protéine de liaison à CREB, la CBP, avec les promoteurs du BDNF. La CBP a une activité histone acétyltransferase : l'association augmente l'acétylation de l'histone H3, ce qui permet l'ouverture de la chromatine pour augmenter la transcription du BDNF (Schmidt et al., 2012).

Une étude récente a montré qu'en bloquant l'augmentation de l'activité histone deacetylase, observée pendant le sevrage à l'alcool, la diminution de BDNF normalement observée était reversée, de même que le comportement anxigène des animaux (You et al., 2014).

Abstinence prolongée, incubation et craving

LE BDNF ENDOGÈNE

Le *craving*, précédemment évoqué, va persister chez des patients abstinents, même au-delà de la période de sevrage physique éventuellement associée à la consommation de la substance. La présence des stimuli associés à la consommation de la drogue peut induire cette sensation de craving, et est appelée « incubation du craving ». Dans certaines régions du cerveau une augmentation progressive des taux de BDNF est observée lors de l'incubation du craving pour les drogues. Par exemple, avec la cocaïne, une augmentation des taux de BDNF à 30 et 90 jours de sevrage est observée dans l'amygdale et dans le Nac alors qu'un jour après l'arrêt du traitement, aucune variation n'est relevée. Ce phénomène semble être spécifique des drogues car aucune variation de BDNF au cours du temps n'est relevée avec une récompense alternative comme le sucre (Grimm et al., 2003). Plusieurs études ont rapporté cette augmentation progressive de BDNF

avec la coca    . R        , Li et ses collaborateurs ont d         une augmentation de la prot       BDNF dans le core du Nac apr     45 jours de sevrage suivant un protocole d'auto-administration de coca    . Cette augmentation se prolonge jusqu'à 90 jours de sevrage, avec une augmentation qui se propage également dans le shell du Nac. Via l'utilisation de lentivirus exprimant un siRNA pour le TrkB, cette étude a montré qu'en atténuant la signalisation BDNF-TrkB dans le core au 1^{er} jour de sevrage, la recherche de coca     était favoris    , alors que cela est sans effet lorsque l'injection est r  alis     plus tardivement dans le sevrage. L'injection de ces m       vecteurs dans le shell att    ue la recherche de coca     mesur     90 jours apr     l'auto-administration : le shell serait donc uniquement impliqu     dans l'incubation lors du sevrage prolong     (Li et al., 2013).

Avec la coca    , une sensibilisation dépendante du BDNF au niveau des synapses excitatrices des neurones dopaminergique est observ     dans l'ATV entre 10 et 15 jours apr     la dernière injection. Il s'agirait d'un phénomène dépendant des récepteurs NMDA et de l'activation post-synaptique du récepteur TrkB. La stimulation de ces synapses par le BDNF endogène pourrait contribuer à la rechute et à la recherche compulsive de drogue en potentialisant l'activité des neurones dopaminergiques lors des présentations des stimuli associés à la drogue (Pu et al., 2006). Avec l'h  ro    , une augmentation des ARNm de BDNF est rapport     dans le cortex préfrontal apr     14 jours d'abstinence alors qu'aucune variation n'est rapport     au 1^{er} jour de sevrage (Kuntz-Melcavage et al., 2009).

LE BDNF EXOGÈNE

Selon la région cibl     ou le protocole de traitement utilis    , le BDNF peut s'avérer être **une cible thérapeutique prometteuse**. Par exemple, le fait d'infuser du BDNF dans le cortex pré-frontal apr     la dernière session d'auto-administration **att    ue le comportement de recherche de coca    ** apr     22h et 6 jours d'abstinence. Au début du sevrage, le BDNF pourrait donc protéger contre des neuroadaptations induites par la drogue, et prévenir la rechute (Berglind et al., 2007). Le mécanisme sous-jacent pourrait impliquer la phosphorylation de la synapsine dans Nac. En effet, apr     l'auto-administration de coca    , une augmentation de la phosphorylation de la synapsine a été relev    , une phosphorylation qui retrouve un niveau de base lors de l'infusion de BDNF. Ceci pourrait restaurer une activité neuronale dans le circuit cortex préfrontal - Nac et participerait à la restauration des stocks vésiculaires au début du sevrage (Sun et al., 2015).

Le BDNF peut aussi **contribuer à la recherche de drogue**. D'une façon générale, comme cela a été précédemment   voqu    , la coca     augmente la signalisation du BDNF dans le Nac (Fumagalli et al.,

2013; Grimm et al., 2003; Huang et al., 2011; Li et al., 2013). En infusant du BDNF dans le shell pendant l'auto-administration de cocaïne, Graham et ses collaborateurs ont constaté une augmentation de la prise de cocaïne dans un protocole d'extinction testé 10 jours après l'auto-administration. Testé dans un protocole de réinstallation, ces mêmes rats présentent une augmentation des appuis sur le levier précédemment associé à la cocaïne, témoignant d'une recherche de cocaïne exacerbée (Graham et al., 2007). Une autre étude rapporte une augmentation de l'expression de CREB dans le shell, laquelle facilite également la rechute dans un protocole d'auto-administration de cocaïne (Larson et al., 2011). Lorsque le BDNF est infusé dans l'ATV, les rats augmentent leur recherche de cocaïne après 3 et 30 jours de sevrage, un phénomène dépendant de la signalisation des MAP kinases (Lu et al., 2004).

Les études chez l'homme

UN BIOMARQUEUR POTENTIEL ?

Tout paramètre biologique utilisé comme un indicateur d'un processus normal ou pathologique et mesurable dans un tissu ou un liquide peut être considéré comme un biomarqueur. Ils servent à aider les cliniciens dans les choix thérapeutiques possibles, ou à suivre l'efficacité d'un traitement. Depuis quelques années, le BDNF a été proposé comme candidat biomarqueur pour évaluer la survenue des rechutes.

Nicotine

Peu d'études relatent les taux de BDNF dans la dépendance à la nicotine, mais l'influence du polymorphisme Val66Met a été décrite. Dans une étude incluant 600 participants d'origine asiatique, les fumeurs possédant l'allèle Met fumeraient plus jeunes que ceux possédant le génotype Val/Val (Zhang et al., 2012). Une autre étude incluant des personnes d'origine germanique montrent que les porteurs de l'allèle Met seraient plus vulnérables à l'initiation et au maintien du comportement de prise de nicotine. Il pourrait s'agir d'un moyen de compenser un dysfonctionnement cognitif, car la nicotine améliore certaines performances mnésiques (Lang et al., 2007). Enfin, une autre étude clinique rapporte des taux élevés de BDNF dans le plasma dans les 2 mois qui suivent l'arrêt du tabac, par rapport à un taux basal (Kim et al., 2007b).

Alcool

Six mois après l'inclusion de patients dépendants, le taux sérique de BDNF augmente par rapport au taux basal mesuré au début de l'étude. L'augmentation du BDNF dans le sérum est visible chez les patients abstinents et non abstinents. Le taux de BDNF était cependant plus élevé chez les individus abstinents par rapport aux non-abstinents (Huang et al., 2008).

Une autre étude rapporte une diminution du taux de BDNF plasmatique par rapport à des sujets témoins. La concentration de BDNF est mesurée 30 jours après l'hospitalisation des individus, afin de minimiser les effets de l'intoxication à l'alcool et du syndrome de sevrage (Chen et al., 2015).

D'un point de vue génétique, une étude a montré que les porteurs des allèles sauvages (Val/Val) sont ceux qui rechutent le plus vite lors de la 1^{ère} année de leur prise en charge thérapeutique (Nees et al., 2015). Lorsque la famille du patient a elle-même connu des dépendances à l'alcool, ce lien est encore plus marqué, ce qui suppose une interaction forte entre le génotype et les facteurs familiaux comme d'autres polymorphismes génétiques. Récemment, une étude chez l'adolescent a montré un lien entre les porteurs de l'allèle Met (Val/Met ou Met/Met) et l'activation du putamen lors de l'anticipation des récompenses. Les adolescents consommant le plus d'alcool sont ceux dont le putamen s'active le moins. Chez les porteurs de l'allèle Met âgés entre 14 et 15 ans, l'activation du putamen prédit leur consommation d'alcool dans les 2 années qui suivent (Lhullier et al., 2015).

Héroïne

Une étude a rapporté une diminution des taux sériques de BDNF chez des patients dépendants à l'héroïne, par rapport à des sujets contrôles (Heberlein et al., 2011). Cependant, une autre étude rapporte des taux de BDNF élevés dans le sérum de patients dépendants aux opiacés (héroïne ou méthadone), avec une corrélation positive pour l'intensité du désir pour la drogue. Le BDNF augmenterait ainsi l'effet récompensant de la drogue (Zhang et al., 2014). Lors du sevrage, les concentrations de BDNF semblent également augmenter, que cela soit au début du sevrage mais également un mois après la consommation d'héroïne (von Diemen et al., 2014). Au regard du polymorphisme Val/Met, une étude a montré que les hommes possédant le génotype hétérozygote Val/Met abusaient de l'héroïne à des âges plus précoces que ceux ayant un génotype homozygote (Val/Val ou Met/Met) (Costa et al., 2011).

Cocaïne

Une diminution du BDNF sérique a été relevée chez des patients dépendants à la cocaïne au début de leur admission à l'hôpital, en comparaison avec des sujets non dépendants. Ce taux augmente progressivement jusqu'à leur sortie (von Diemen et al., 2014). Une autre étude retrouve une augmentation du taux de BDNF chez des patients dépendants à la cocaïne 12 jours après l'arrêt de la drogue et cette augmentation corrèle positivement avec le craving pour la cocaïne. Ainsi, le taux de BDNF dans le sérum a été proposé comme biomarqueur potentiel de l'addiction à la cocaïne (Corominas-Roso et al., 2013). Quelques temps auparavant, le BDNF était déjà proposé comme bon biomarqueur de la rechute : plus le taux de BDNF sérique était élevé, plus la rechute était proche dans le temps. Les patients abstinents depuis 3 semaines présentent également une sensibilité de l'axe hypothalamo-hypophysaire (cortisol et ACTH), lequel peut moduler le BDNF (D'Sa et al., 2011). Le stress étant lié à la possibilité de rechute, les changements dans le taux périphérique de BDNF peuvent refléter les adaptations du système de stress avec la rechute à la cocaïne.

Objectif général de la thèse

Comme nous venons de le voir de façon non exhaustive, les mécanismes qui sous-tendent l'addiction sont loin d'être compris et de très nombreuses neuroadaptations se mettent en place à différents stades de la maladie.

Un des **problèmes majeurs** de la prise en charge des personnes dépendantes est le **très fort taux de rechute** même après de longues périodes d'abstinence. Une certaine mémoire perdue, ré-activable par des stimuli associés à la prise de drogues, et responsable très certainement de cette vulnérabilité à la rechute. Il est essentiel de mieux comprendre cette mémoire et c'est dans cet objectif que mes travaux de thèse se sont inscrits.

Comme explicité dans le chapitre 2, l'anticipation des récompenses joue très certainement un rôle essentiel, et différentes études ont mis en évidence des libérations de neurotransmetteurs comme la dopamine (Benturquia et al., 2008; Puig et al., 2012; Schultz, 1998), ou les enképhalines (Nieto et al., 2002) lors de ce phénomène. De plus, des études préliminaires avaient mis en évidence des augmentations de BDNF dans le Nac (Puig, 2012) après un traitement chronique à la cocaïne. Ces augmentations spontanées surviennent au début du sevrage, spécifiquement à l'heure où les animaux avaient l'habitude de recevoir l'injection de cocaïne et perdurent dans le temps puisqu'elles sont également observées au 14ème jour de sevrage.

L'objectif général de ce travail de thèse a été de **caractériser les mécanismes cellulaires et moléculaires à la base de cette « mémoire neurochimique»** qui se manifeste spontanément lors du sevrage, spécifiquement à l'heure où les animaux avaient l'habitude de recevoir la drogue. Ce phénomène pourrait être à la base d'une vulnérabilité plus importante à la rechute.

Le BDNF jouant un rôle essentiel dans la neuroplasticité et la neurobiologie des addictions, le premier objectif de ce travail a donc été de déterminer (1) si les régulations de BDNF précédemment observées avec la cocaïne étaient retrouvées avec une autre drogue : la morphine et (2) d'élucider plus précisément les altérations de la cascade de signalisation du BDNF et de son récepteur TrkB.

Nous avons poursuivi l'exploration de cette mémoire neurochimique induite par des injections répétées de morphine en étudiant les libérations extracellulaires de dopamine, glutamate et GABA dans le Nac. Le BDNF et son récepteur TrkB étant présents sur les neurones synthétisant ces

neurotransmetteurs, nous avons également évalué l'existence de corrélations avec les altérations de BDNF observées.

Les mécanismes de mémoire mettent aussi en jeu des réarrangements réversibles des réseaux de neurones, et comme nous l'avons vu dans le chapitre 3, le BDNF joue un rôle essentiel dans cette plasticité. Le 3^{ème} objectif de ce travail a donc porté sur **l'étude des modifications morphologiques des neurones lors de l'anticipation des injections dans le Nac.**

Enfin, les quantités de BDNF périphériques pouvant refléter les concentrations centrales de cette neurotrophine, le quatrième et dernier objectif a été de **déterminer si les variations de BDNF centrales observées lors de l'anticipation des injections étaient (1) retrouvées au niveau périphérique dans le sang, et (2) retrouvées avec une récompense naturelle.** Le taux périphérique de BDNF pendant le sevrage a donc été comparé avec 3 traitements différents (cocaïne, morphine et récompense naturelle). Ces résultats ont été publiés dans un article en 2014, et laissent présager des perspectives cliniques intéressantes qui seront discutées.

Résultats

***“However beautiful the strategy, you should occasionally
look at the results “***

Winston Churchill

OBJECTIF 1 : ÉTUDE DES MODIFICATIONS DE LA SIGNALISATION DU BDNF INDUITES APRÈS UN TRAITEMENT CHRONIQUE À LA MORPHINE

Le premier objectif de ce travail a été de **déterminer les modifications à court et plus long termes** qui se mettent en place après 14 jours de traitement à la morphine (5mg/kg, s.c.) au niveau central, dans les 2 sous-régions du Nac. Les modifications ont été étudiées au **1^{er} et au 14^{ème} jour de sevrage**, en distinguant des **altérations à l'heure habituelle d'injection de morphine par rapport à une autre heure dans la journée**, pour le taux basal.

Le **BDNF** dans sa forme **pro et mature**, ainsi que **le récepteur TrkB**, et une de ses isoformes : le **récepteur tronqué TrkB.T1** ont été quantifiés par western blot. **L'activateur de plasminogène tissulaire tPA** a également été quantifié afin d'observer un éventuel processus de maturation au cours du temps. Enfin, le **ratio pCREB/CREB(T)**, reflet de l'activation de la signalisation BDNF-TrkB a été étudié.

L'analyse des résultats pour le 1^{er} jour de sevrage est actuellement en cours et sera présentée lors de la soutenance orale de ces travaux de thèse. Les résultats qui suivent correspondent à ceux obtenus 14 jours après l'arrêt des injections de morphine. La méthodologie réalisée pour cet objectif est détaillée ci-après.

Méthodologie liée à l'objectif 1

Animaux

Les expériences ont été menées sur des rats mâles Sprague-Dawley (Janvier, France), pesant en moyenne 300 g au début des expériences. Les animaux ont été acclimatés à l'animalerie et manipulés quotidiennement par l'expérimentateur une semaine avant le début des traitements pharmacologiques. Les conditions d'hébergement ont été contrôlées et relevées de sorte que la température moyenne était comprise entre 21 et 23°C. Le cycle jour/nuit était de 12 heures, avec la lumière allumée à partir de 8h. Les animaux ont eu accès à de l'eau et de la nourriture fournie *ad libitum*. Le nombre d'animaux utilisés et leur degré de souffrance ont été minimisés selon les indications précisés dans le protocole n° CEEA34.NB.127.12.

Agent pharmacologique

La morphine (Morphine HCl, Francopia) a été dissoute dans une solution saline (NaCl à 0.9 %), à raison d'une dose de 5mg/kg injectée par voie sous-cutanée pour un volume de 1mL/kg de poids corporel. Le groupe contrôle a été traité dans les mêmes conditions avec la solution saline.

Protocole de traitement

La répartition des animaux s'est faite de façon aléatoire. Les animaux ont reçu 1 injection de morphine (5mg/kg, s.c.) par jour pendant 14 jours consécutifs, **tous les jours à la même heure**. Le groupe contrôle a reçu de la solution saline dans les mêmes conditions. Les rats ont ensuite été replacés dans leur cage d'habitation. Quatorze jours après l'arrêt des traitements, les animaux ont été sacrifiés (pentobarbital, i.p.), soit à l'heure habituelle d'injection de morphine ou de solution saline, soit en dehors de l'heure habituelle d'injection (5 heures après l'heure habituelle d'injection, pour avoir un taux de base). Les cerveaux ont été collectés et congelés instantanément dans de l'isopentane. Ils ont ensuite été stockés au congélateur à -80°C en attendant leur analyse.

Analyses biochimiques

Extraction des protéines, dosages et préparation des échantillons

A partir d'un cerveau de rat entier, les structures cérébrales d'intérêt sont disséqués (Harris, MicroPunch®, Nucleus *accumbens core* (1,2 mm), *shell* (0,5 mm) et mis en présence de 50 µL tampon de lyse (Hepes (25mM – pH 7,4), NaCl (500mM), EDTA (1mM), NaF (20mM), NP-40 (0,1% v/v) et 1 pastille d'inhibiteur de proteases (Roche, contient 1mM de EDTA)) et d'une solution anti-phosphatase (Sigma, Cocktail 2, 1 :100). Les échantillons ont été ensuite soniqués (Bandelin, SONOPLUS mini 2) environ 30 secondes puis centrifugés à 4 °C à 14'000 rpm (Sigma 1-15k) pendant 2 minutes. Le surnageant est récupéré pour doser la quantité de protéines dans chaque échantillon. Le dosage protéique a été réalisé selon la méthode de Bradford. Les protéines ont ensuite été dénaturées avec du *Sample buffer* (62.5mM Tris-HCl [pH 6.8], 2% SDS, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 0.001% bromophenol blue). Les échantillons ont été déposés dans un bain sec à 95°C pendant 5 minutes. A la sortie du bain sec, les échantillons sont laissés à température ambiante quelques minutes avant d'être stockés à -20°C.

Western blot

Cette technique semi-quantitative permet de séparer les protéines présentes dans un échantillon en fonction de leur masse moléculaire via un système de détection par anticorps. Les protéines proBDNF, BDNF mature, TrkB. T1, TrkB.FL, pCREB/CREB(T) et tPA ont été quantifiées dans les surnageants des homogénats tissulaires cérébraux des rats traités et contrôles. Un marqueur interne, la β-actine a été utilisé afin d'effectuer les quantifications relatives sous forme d'unité arbitraire : la densité optique de la protéine d'intérêt mesurée à toujours été normalisée à la quantité de β-actine mesurée dans l'échantillon. Afin d'évaluer un maximum de protéines sur un même gel, des gels commerciaux à gradients de concentrations ont été utilisés (*Bio-Rad, mini-Protean TGX gels, 15 puits, 15µL, 4-15% d'acrylamide*) et placés dans la cuve de migration (*Bio-Rad, Mini-PROTEAN Tetra system*) avec le tampon de migration (Tris (25mM), glycine (192mM) et SDS (0,1% m/v)) préparé *ex tempore*. Le standard de poids moléculaires connu (Precision plus Protein standards, *Bio-rad, Kaleidoscope, 10µL*) et les échantillons (10 µg) ont été déposés dans le gel. La **migration des protéines** s'effectue à 250V et est arrêtée lorsque le front de migration atteint l'extrémité inférieure des gels.

L'électro-transfert des protéines du gel vers une membrane de PVDF (Immobilon-P, 0,45 µm, Millipore) s'effectue dans du tampon de transfert (Tris (25mM), glycine (192mM) et éthanol (20%

v/v)) préparé extemporanément. Le transfert est effectué à 100V pendant 1 heure à 4°C sous agitation magnétique. Au préalable, la membrane de PVDF est activée avec du méthanol.

Lorsque le transfert est terminé, la membrane est récupérée et lavée avec du TBS 1X. La membrane est alors mise en présence de **tampon de blocage** pendant une heure sous agitation à température ambiante. Le blocage des membranes s'effectue dans du lait écrémé 5% et TBS-t 0,1%. Après l'étape de blocage, la membrane est mise en présence des différents **anticorps primaires** d'intérêt (tableau 2) sous agitation toute la nuit en chambre froide à 4°C.

Le lendemain, la membrane est rincée 3 fois dans du TBS-t 0,1% pendant 10 minutes avant de la mettre en présence d'anticorps secondaire couplés à une peroxydase pendant 1h. Après 3 nouveaux rinçages au TBS-t 0,1% pendant 10 minutes, les complexes antigènes-anticorps sont révélés par chimiluminescence par le réactif Luminata Forte (*Millipore, Western HRP substrate*). La révélation se fait via l'appareil ImageQuant 4000 (*GE Healthcare Life Sciences*). La quantification est faite avec le logiciel ImageQuant TL et est réalisée par mesure de densitométrie (*GE Healthcare Life Sciences*). Les contrastes ont été légèrement modifiés pour la présentation de l'ensemble des résultats.

Pour l'analyse du ratio pCREB/CREB total, les membranes ont été deshybridées (Pour 1L de solution : 15g de glycine, 1g SDS, 10 mL tween 20 + H₂O distillée en quantité suffisante pour 1L, ajustement du pH 2.2) avant de remettre en présence les anticorps anti-CREB(T) et anti- β -actine.

Analyses statistiques

Les comparaisons réalisées sont faite à partir de la densitométrie des bandes d'une même membrane, comprenant l'ensemble des échantillons des 2 groupes comparés (n=4-6/groupe). Les résultats sont exprimés en moyenne et écart standard à la moyenne (+/-SEM). L'analyse des variations du taux des différentes protéines s'est faite par comparaison de moyenne avec le test t de Student. $P < 0,05$ a été choisi comme seuil de significativité. Les analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 5.03.

Types	Noms	Origine	Espèce	dilution
Anticorps primaires	Anti-proBDNF	Alomone labs	Lapin	1/1000
	Anti-mBDNF	Alomone labs	Lapin	1/600
	Anti-TrkB.T1	Santa Cruz Biotechnology	Lapin	1/500
	Anti-TrkB.FL	Alomone labs	Lapin	1/800
	Anti-tPA	Santa Cruz Biotechnology	lapin	1/500
	Anti-phospho CREB (Ser133)	Merck Millipore	Lapin	1/800
	Anti-CREB(T)	Merck Millipore	lapin	1/800
	Anti-��-actine	Sigma	souris	1/20 000
Anticorps secondaires	anti-IgG de souris couplés HorseRadish Peroxidase (HRP)	Sigma	chèvre	1/50 000
	anti-IgG de lapin couplés HorseRadish Peroxidase (HRP)	Sigma	��ne	1/50 000

Tableau 2 : Synthèse des fournisseurs et facteurs de dilution des anticorps primaires et secondaires

Conséquences d'un traitement chronique à la morphine 14 jours après la dernière injection

DANS LE NOYAU ACCUMBENS CORE

Quatorze jours après l'arrêt des traitements, une forte augmentation de l'expression du BDNF mature ($t_{(9)}=5.298$; $p=0.0005$) (figure 16 B) ainsi que du tPA ($t_{(8)} = 3.3$; $p=0.0109$) (figure 16 F) sont observées chez les rats traités à la morphine par rapport aux contrôles. En revanche, une diminution significative du ratio pCREB/CREB(t) est mesurée chez les animaux traités à la morphine par rapport aux rats contrôles ($t_{(9)} =2.464$; $p=0.0359$).

Aucune différence significative entre les taux de proBDNF (figure 16 A), le taux de récepteurs TrkB entiers et tronqués (figure 16 C et 16 D) n'a été rapportée chez les animaux traités à la morphine par rapport aux animaux contrôles traités à la solution saline, dans le Nac core.

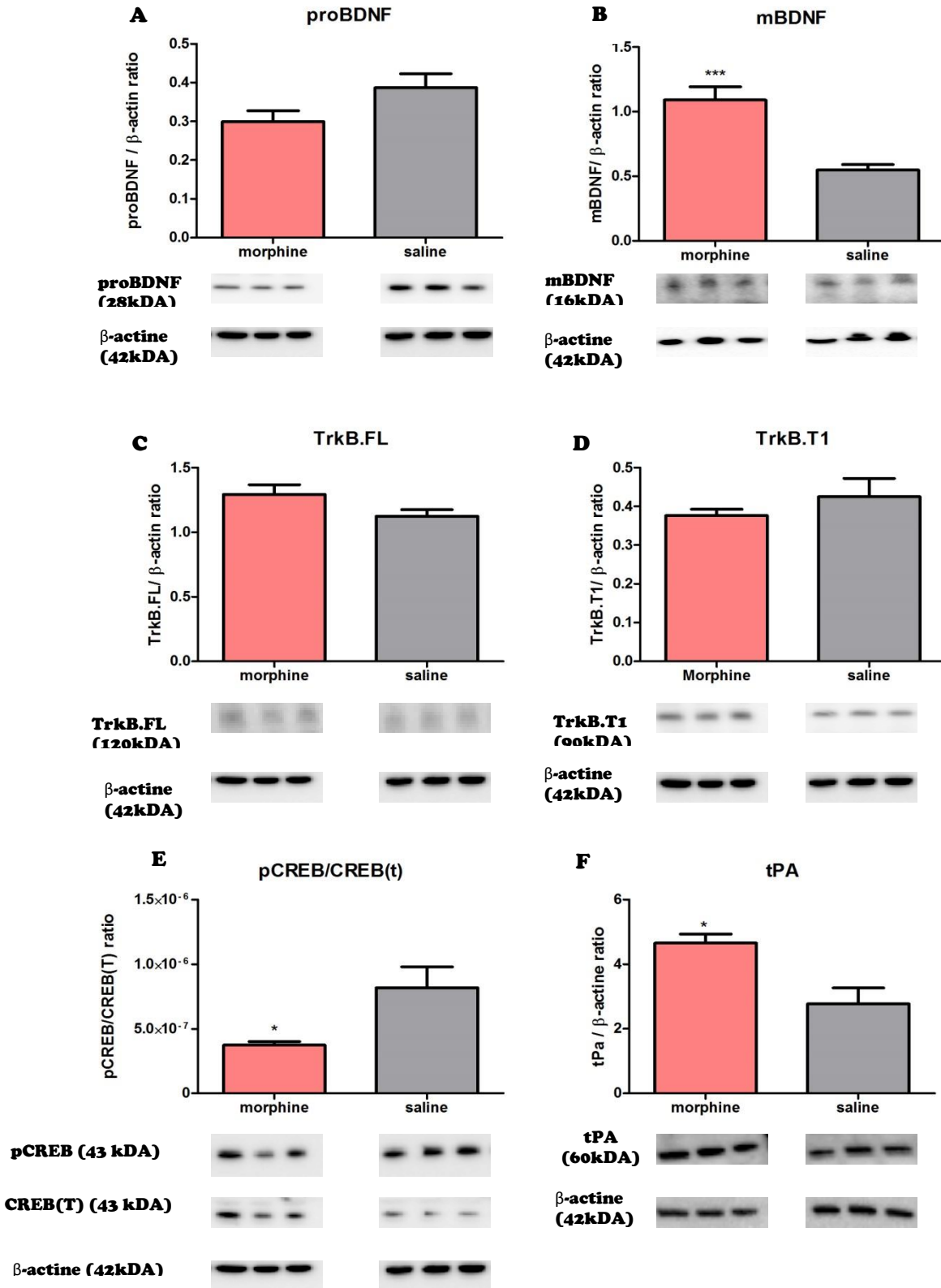


Figure 16 : Expression du proBDNF, BDNF mature, TrkB entier et tronqué et activation de la voie CREB après 14 jours de sevrage dans le *noyau accumbens core*

Mesure du taux de base du proBDNF(A), mBDNF (B), du récepteur TrkB (C) et du récepteur tronqué TrkB.T1 (D), du ratio pCREB/CREB total (E) et du taux de tPA (F) au 14^{ème} jour de sevrage chez des animaux traités à la morphine pendant 14 jours par rapport à des animaux contrôles traités à la solution saline par western blot. Les comparaisons des taux de base des différentes protéines ont été réalisées par comparaison de moyennes avec le test t de Student. Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0.05$. (* $p < 0.05$) (n=3-6 par groupe, les échantillons des 2 groupes ont été déposés sur un même gel)

DANS LE NOYAU ACCUMBENS SHELL

Dans le shell, le traitement à la morphine semble avoir un effet opposé sur le récepteurs TrkB et son isoforme : une augmentation significative du récepteur TrkB entier (figure 17 C) a été observé ($t_{(9)} = 3.190$; $p = 0.011$) tandis qu'une diminution significative de l'isoforme tronquée TrkB.T1 (figure 17 D) est rapportée ($t_{(9)} = 3.842$; $p = 0.004$) chez les animaux traités à la morphine par rapport aux contrôles. L'expression du tPA est également diminuée chez les rats traités à la morphine (figure 17 F) ($t_{(7)} = 2.511$; $p = 0.0404$).

Cependant, il n'y a pas de différence significative entre les taux de proBDNF (figure 17 A), de BDNF mature (Figure 17 B), et du ratio pCREB/CREB(t) (figure 17 E) chez les animaux traités à la morphine par rapport aux animaux contrôles traités à la solution saline.

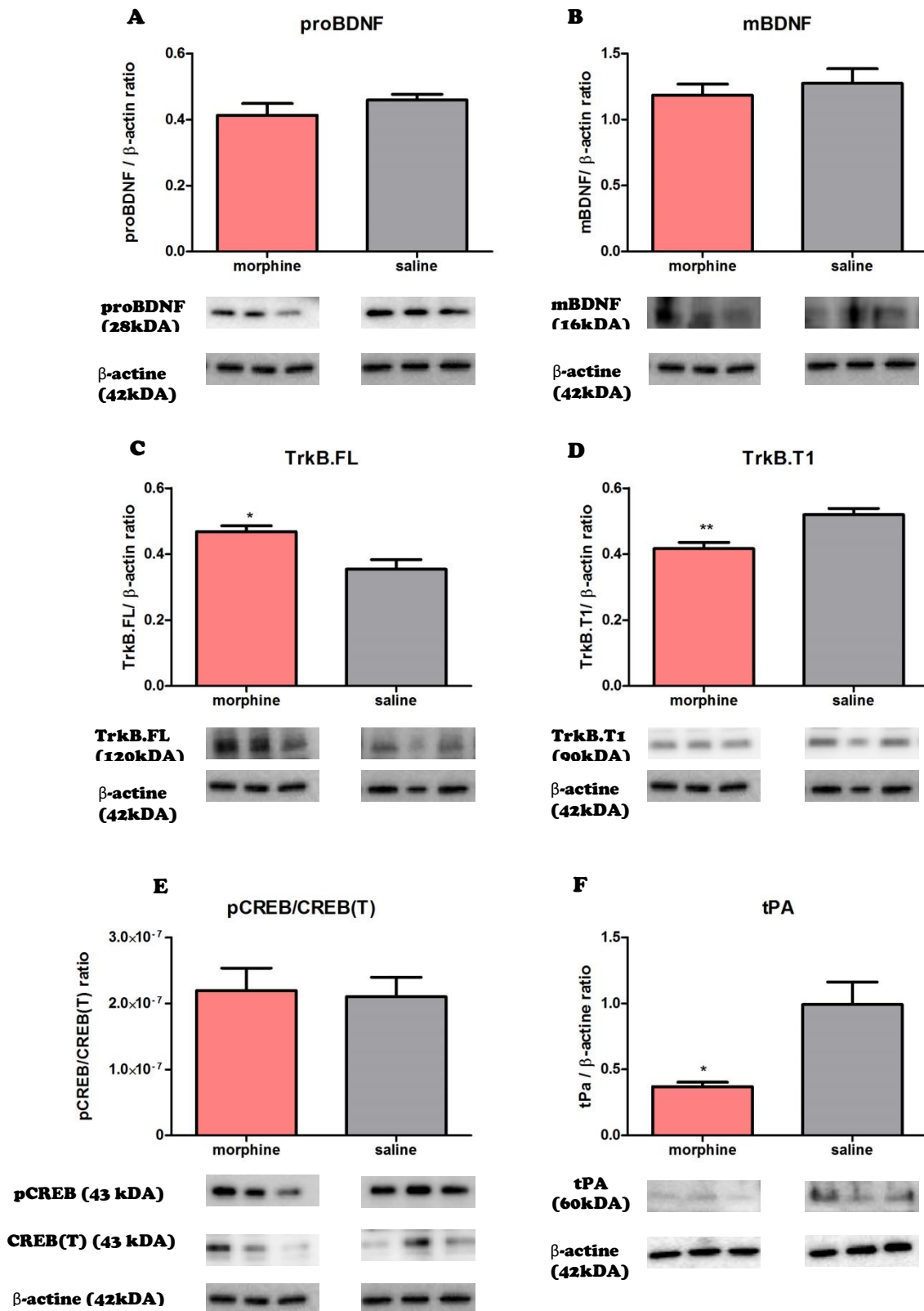


Figure 17: Expression du proBDNF, BDNF mature, TrkB entier et tronqué et activation de la voie CREB après 14 jours de sevrage dans le noyau accumbens shell

Mesure du taux de base de proBDNF(A), mBDNF (B), du récepteur TrkB (C) et du récepteur tronqué TrkB.T1 (D) et du ratio pCREB/CREB total (E) et du taux de tPA (F) au 14^{ème} jour de sevrage chez des animaux traités à la morphine pendant 14 jours par rapport à des animaux contrôles traités à la solution saline par western blot. Les comparaisons des taux de base des différentes protéines ont été faites par comparaison de moyennes avec le test t de Student. Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0.05$. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) ($n = 3-6$ par groupe, les échantillons des 2 groupes ont été déposés sur un même gel).

Conséquences d'un traitement chronique à la solution saline lors de l'anticipation des injections

DANS LE NOYAU ACCUMBENS CORE

Quatorze jours après l'arrêt des injections, l'expression de l'ensemble des protéines quantifiées n'est pas altérée entre l'heure habituelle d'injection de solution saline par rapport à une autre heure dans la journée, dans le Nac core (figure 18 A-F)

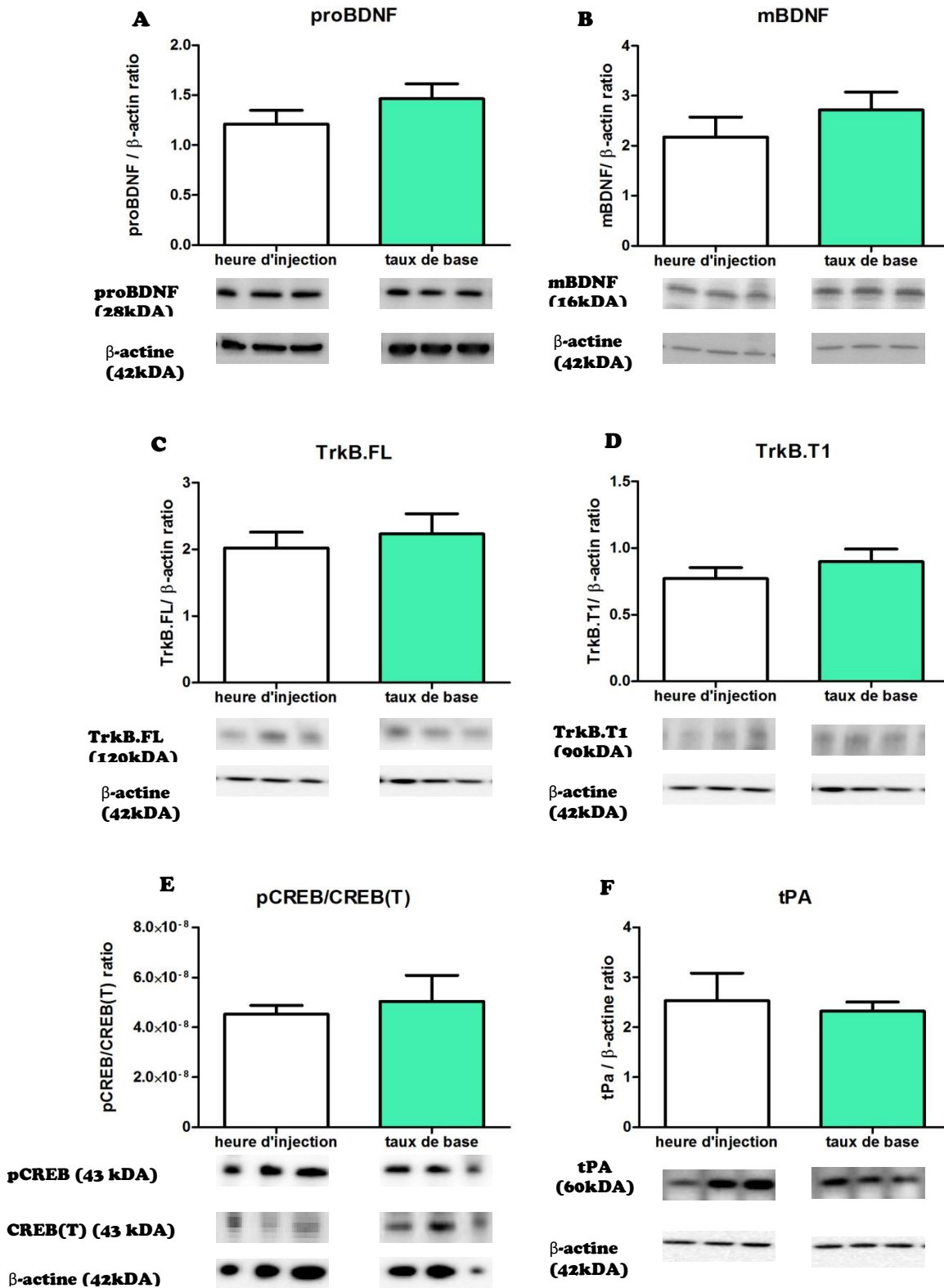


Figure 18 : Expression du proBDNF, BDNF mature, TrkB entier et tronqué et activation de la voie CREB après 14 jours d'arrêt des injections de solution saline dans le noyau accumbens core

Mesure du taux de proBDNF (A), mBDNF (B), du récepteur TrkB (C) et du récepteur tronqué TrkB.T1 (D), du ratio pCREB/CREB total (E) au 14^{ème} jour de sevrage et du taux de tPA (F) chez des animaux traités à la solution saline pendant 14 jours par western blot. Les comparaisons entre l'heure habituelle d'injection de solution saline et le taux basal des différentes protéines ont été faites par comparaison de moyennes avec le test t de Student. Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$.) ($n = 5-6$ par groupe, les échantillons des 2 groupes ont été déposés sur un même gel) (* $p < 0,05$)

DANS LE NOYAU ACCUMBENS SHELL

Quatorze jours après l'arrêt des injections de solution saline, seule l'expression du BDNF mature varie dans le Nac shell : une augmentation significative est relevée à l'heure habituelle d'injection de solution saline, par rapport au taux basal (figure 19 B) ($t_{(10)} = 2.249$; $p=0.0483$). L'expression des autres protéines ne varie pas (figure 19 A, C, D, E, F).

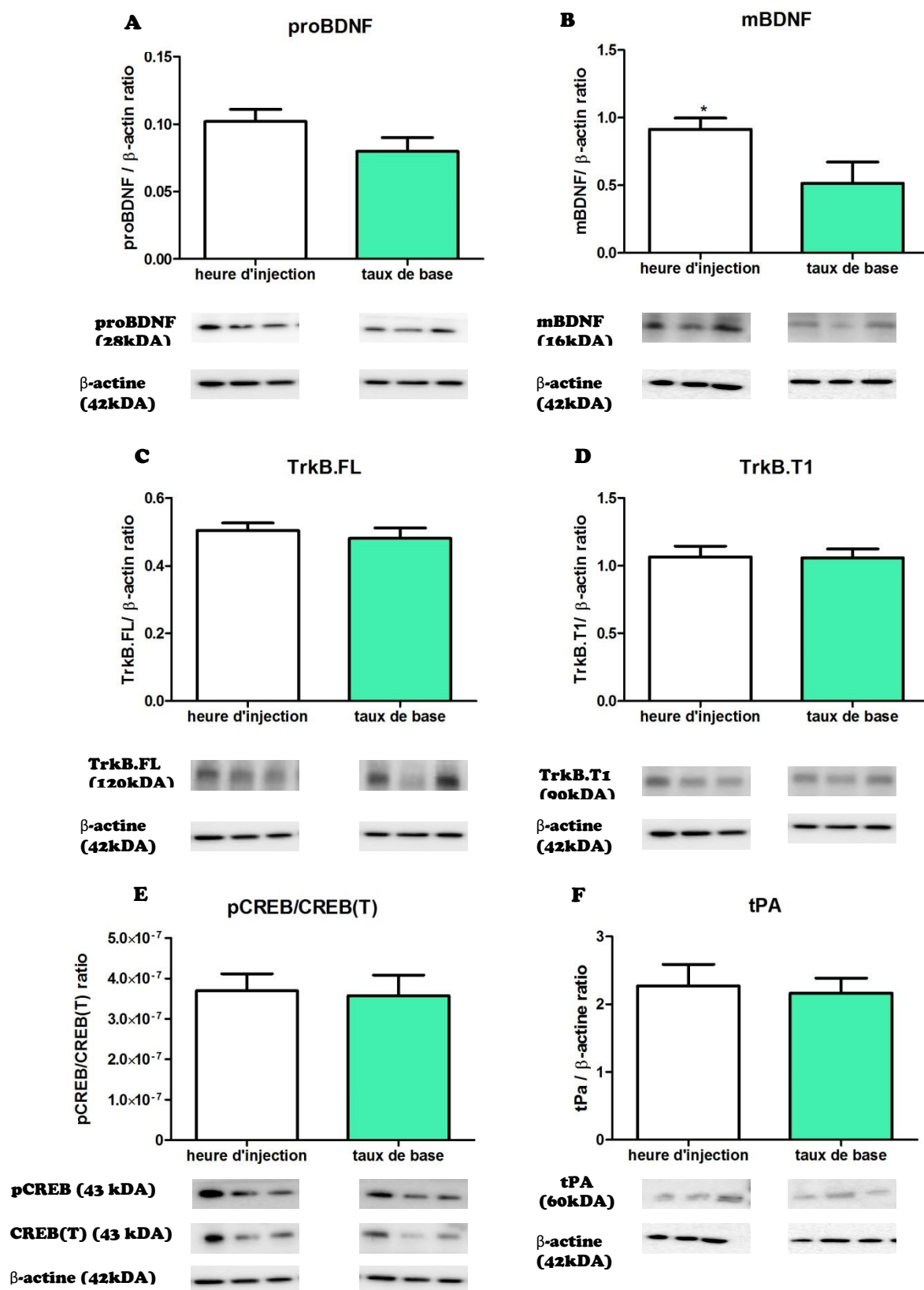


Figure 19 : Expression du proBDNF, BDNF mature, TrkB entier et tronqué et activation de la voie CREB après 14 jours d'arrêt des injections de solution saline dans le *noyau accumbens shell*

Mesure du taux de proBDNF(A), mBDNF (B), du récepteur TrkB (C) et du récepteur tronqué TrkB.T1 (D), du ratio pCREB/CREB total (E) et du taux de tPA(F) au 14^{ème} jour de sevrage chez des animaux traités à la solution saline pendant 14 jours par western blot. Les comparaisons entre l'heure habituelle d'injection de solution saline et le taux basal des différentes protéines ont été faites par comparaison de moyennes avec le test t de Student. Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0.05$. ($n=5-6$ par groupe, les échantillons des 2 groupes ont été déposés sur un même gel)

Conséquences d'un traitement chronique à la morphine lors de l'anticipation des injections

DANS LE NOYAU ACCUMBENS CORE

Une augmentation importante de proBDNF (figure 20 A) est relevée à l'heure habituelle d'injection par rapport à une autre heure dans la journée ($t_{(9)} = 4.86$; $p=0.009$), de même qu'une augmentation significative de BDNF mature (figure 20 B) ($t_{(9)} = 2.27$; $p= 0.0494$).

Une augmentation significative du récepteur TrkB tronqué (figure 19 D) à l'heure habituelle d'injection par rapport au taux de base ($t_{(9)}=2.394$; $p=0.0403$) est également observée.

En revanche, aucune différence significative n'est relevée pour le taux des récepteurs TrkB entiers (figure 20 C), pour ratio pCREB/CREB(T) (figure 20 E) et pour le taux de tPA (figure 20 F) à l'heure habituelle d'injection de morphine par rapport à une autre heure dans la journée, dans le Nac core.

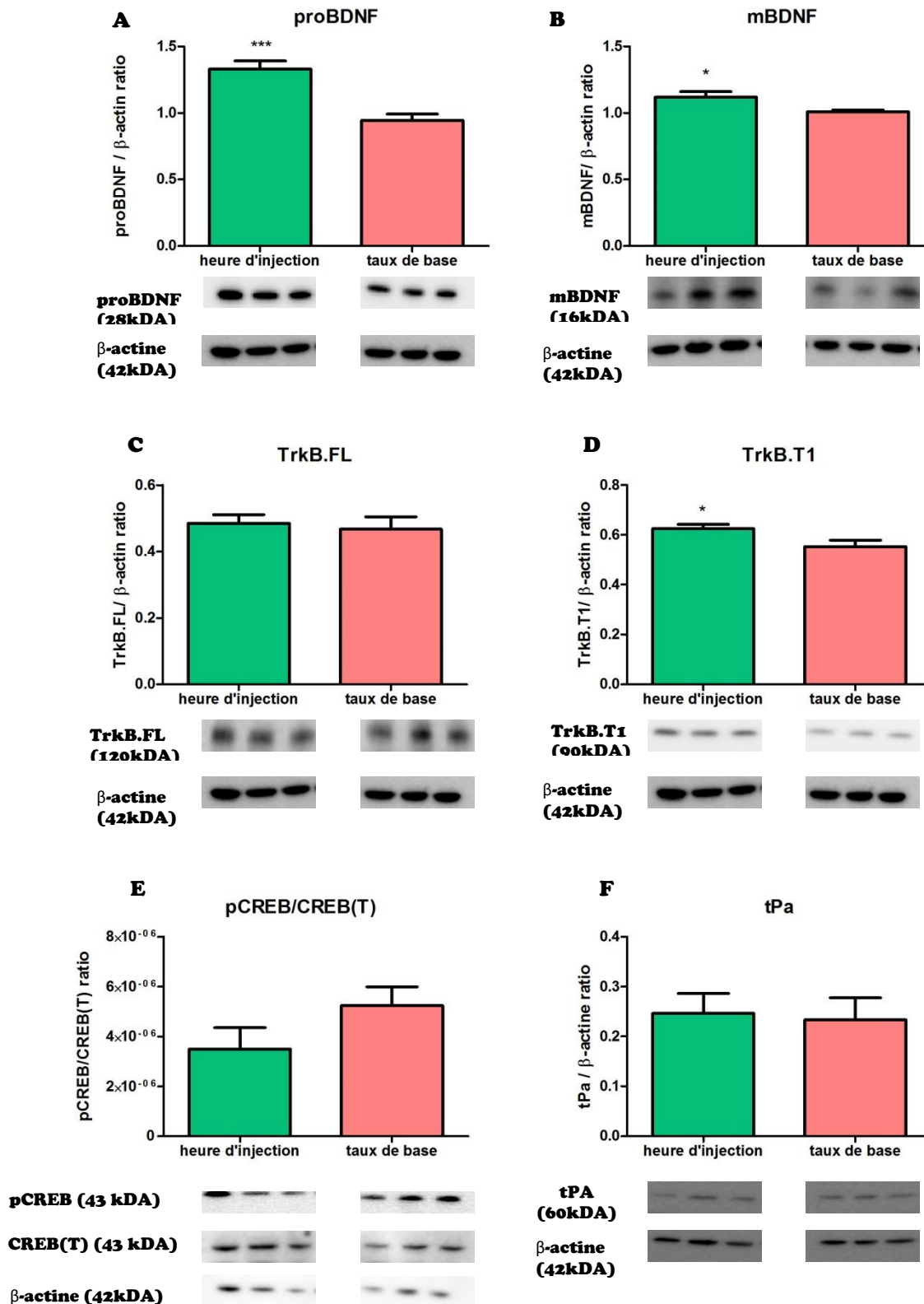


Figure 20 : Expression du proBDNF, BDNF mature, TrkB entier et tronqué, tPA et activation de la voie CREB à l'heure habituelle d'injection de morphine après 14 jours d'arrêt du traitement dans le noyau accumbens core

Mesure du taux de proBDNF (A), mBDNF (B), du récepteur TrkB (C) et du récepteur tronqué TrkB.T1 (D), du ratio pCREB/CREB total (E), et du tPA (F) au 14^{ème} jour de sevrage chez des animaux traités à la morphine pendant 14 jours par western blot. Les comparaisons entre l'heure habituelle d'injection de solution saline et le taux basal des différentes protéines ont été faites par comparaison de moyennes avec le test t de Student. Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0.05$. *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ ($n = 5-6$ par groupe, les échantillons des 2 groupes ont été déposés sur un même gel).

DANS LE NOYAU ACCUMBENS SHELL

Dans le shell, aucune différence significative n'est relevée pour le taux de proBDNF (figure 21 A), de BDNF mature (figure 21 B), des récepteurs TrkB entiers (figure 21 C), du tPA (figure 21 F) et du ratio pCREB/CREB(T) (figure 21 E) à l'heure habituelle d'injection de morphine par rapport à une autre heure dans la journée, dans le *noyau accumbens shell*, au 14^{ème} jour de sevrage après un traitement de 14 jours à la morphine. Alors qu'une augmentation significative a été observée dans le core, dans le shell, une diminution significative des récepteurs TrkB.T1 (figure 21 D) a été quantifiée à l'heure habituelle d'injection de morphine ($t_{(8)}=3.335$; $p=0.0103$).

Résumé des résultats obtenus dans l'objectif 1

A

WD14	CORE	SHELL
Morphine <i>versus</i> saline		
proBDNF	=	=
mBDNF	↗↗↗	=
TrkB.FL	=	↗
TrkB.T1	=	↘↘
pCREB/CREB(t)	↘	=
tPA	↗	↘

B

WD14	CORE	SHELL
Saline heure d'injection <i>versus</i> taux de base		
proBDNF	=	=
mBDNF	=	↗
TrkB.FL	=	=
TrkB.T1	=	=
pCREB/CREB(t)	=	=
tPA	=	=

C

WD14	CORE	SHELL
Morphine heure d'injection <i>versus</i> taux de base		
proBDNF	↗↗↗	=
mBDNF	↗	=
TrkB.FL	=	=
TrkB.T1	↗	↘
pCREB/CREB(t)	=	=
tPA	=	=

Tableau 3 : Bilan des résultats obtenus sur la signalisation du BDNF au 14^{ème} jour de sevrage dans le noyau accumbens

(A) Chez les animaux traités à la morphine et les animaux contrôles

(B) Chez les animaux contrôles

(C) Chez les animaux traités à la morphine

Les flèches reflètent le niveau de significativité des résultats : ↗/↘ : p<0.05 ; ↘↘ : p<0.01 ; ↗↗↗ : p<0.001 vs aux contrôles respectifs (contrôle saline (A), contrôle taux de base (B, C))

Discussion partielle des résultats obtenus dans l'objectif 1

Le but de cette partie était d'avoir une vue d'ensemble sur les modifications à long terme de la voie de signalisation BDNF-TrkB dans le Nac qui se mettent en place lors du sevrage (1) après un traitement chronique à la morphine et (2) lors de l'anticipation des injections. Les résultats obtenus montrent que dans notre protocole, 14 jours après la dernière injection de morphine, l'expression des protéines de la voie de signalisation du BDNF-TrkB est globalement augmentée lors du sevrage chez les animaux traités par rapport aux contrôles.

Lors de l'anticipation des injections de morphine, l'expression des protéines proBDNF et BDNF mature sont augmentées à l'heure habituelle d'injection de morphine par rapport à une autre heure de la journée spécifiquement dans le Nac core.

Conséquences à long terme d'un traitement chronique à la morphine sur la signalisation du BDNF :

Dans le Nac core, l'expression du BDNF mature et du tPA augmente au 14^{ème} jour de sevrage après un traitement chronique à la morphine. Bien que non significative, on note aussi une tendance de l'expression du proBDNF à diminuer. Ces résultats vont dans le sens d'une maturation du proBDNF en BDNF mature par un mécanisme dépendant du tPA. De façon concordante avec nos résultats, une augmentation des ARN messagers du tPA dans le Nac de souris après un traitement à la morphine a été montrée, que cela concerne un traitement aigu (+ 772% par rapport aux contrôles) ou un traitement chronique (+ 150 % par rapport aux contrôles) (Nagai et al., 2004a). En revanche, jusqu'à présent, la régulation du tPA lors du sevrage après un traitement chronique à la morphine n'avait pas été étudiée.

Une augmentation du BDNF lors du sevrage aux opiacés avait déjà été observée dans des études précédentes. Après 14 jours d'abstinence forcée, en remettant les animaux dans la cage d'auto-administration d'héroïne sans aucune injection de drogue, une augmentation de BDNF a été montrée par RT-qPCR par rapport aux rats contrôles dans le CPFm (Kuntz-Melcavage et al., 2009). Chez l'homme, un mois après l'arrêt de la consommation d'héroïne, le taux de BDNF périphérique augmente également par rapport à un taux basal pris au début de l'étude chez les individus dépendants (Zhang et al., 2014).

L'augmentation du BDNF est peut-être le reflet d'une adaptation de l'organisme pour se protéger, comme cela a été montré pour l'éthanol par exemple où le BDNF réduit la consommation d'éthanol par un processus dépendant de la voie des MAPK dans le striatum dorso-latéral (Jeanblanc et al., 2009, 2013). Cependant, l'augmentation de BDNF pourrait aussi être liée au phénomène d'incubation du craving, comme cela a été montré avec la cocaïne, où l'augmentation de la recherche de cocaïne via des indices préalablement associés à la prise lors de l'abstinence est corrélée avec une augmentation de BDNF au cours du temps (Grimm et al., 2003). Ce phénomène participerait également à la réinstallation du comportement de prise de drogue (Ghitza et al., 2010).

Bien que l'expression du BDNF augmente dans le core, aucune régulation des récepteurs (TrkB et son isoforme TrkB.T1) n'a été observée dans cette région lors du sevrage à la morphine dans nos conditions expérimentales. Dans le locus coeruleus, une augmentation des ARNm de BDNF a été relevée après un traitement chronique à la morphine, sans qu'aucune régulation des récepteurs TrkB n'ait été observée. En revanche, une augmentation des ARNm de BDNF 2, 6, 20 et 70 heures après l'injection de naltrexone a été observée ainsi qu'une augmentation des ARNm de TrkB, mais seulement 2 et 6 heures après un sevrage précipité. La régulation des récepteurs semble donc très dynamique dans le temps (Numan et al., 1998).

Enfin, nous avons observé une diminution du ratio pCREB/CREB(T) lors du sevrage, spécifiquement dans le core. Il s'agit d'un résultat surprenant car si la signalisation du BDNF-TrkB est activée, une activation du facteur de transcription CREB est plus attendu qu'une répression. Il est donc probable que cette diminution pCREB/CREB(T) soit indépendante de la signalisation du BDNF, le facteur CREB étant un facteur de transcription impliqué dans de nombreuses voies de signalisation. Une étude a montré qu'après un traitement chronique à la morphine, une diminution des taux de CREB était observée dans le Nac (Widnell et al., 1996). Une diminution de pCREB a également été observée dans le cortex de rat sevré après une intoxication à l'éthanol dans l'eau de boisson pendant 15 jours (Pandey et al., 2001).

L'implantation de pastilles de morphine, ou des injections chroniques de morphine par voie intrapéritonéale provoquent également une diminution de l'expression du BDNF dans l'ATV (Koo et al., 2012). Pendant le sevrage, après un traitement à la morphine 2 fois par jour pendant 14 jours, une diminution du nombre de cellules exprimant le BDNF a été relevée dans l'ATV au 14^{ème} jour de sevrage (Chu et al., 2007). La déplétion de BDNF dans l'ATV est-elle le reflet d'un transport vers le Nac ? Le BDNF synthétisé dans les neurones dopaminergiques de l'ATV peut en effet être transporté de manière antérograde et être libéré dans le Nac (Altar et al., 1997). On peut en effet s'interroger sur la provenance du BDNF. Est-il transporté vers le Nac depuis le CPFm ou l'ATV ? Est-il directement

synthétisé dans le Nac core ? Est-ce un effet synergique provenant à la fois d'un transport et d'une synthèse intra-Nac ?

Contrairement au core, dans le shell, ni l'expression de la protéine précurseur, ni celle du BDNF mature ne varient. La régulation du BDNF après un traitement à la morphine semble donc très dépendante de la région d'intérêt étudiée. Aucune modification du BDNF dans l'hippocampe n'a par exemple été observée 24 et 96 heures après l'implantation de pastilles de morphine chez des souris (Arguello et al., 2009). En revanche, nous observons une augmentation significative du récepteur TrkB.FL et une diminution du récepteur TrkB.T1. Le récepteur TrkB.T1 a été montré comme jouant le rôle de dominant négatif, formant un complexe hétérodimérique avec le récepteur TrkB.FL pour séquestrer le BDNF et empêcher l'activation de la voie de signalisation. Ainsi, même si l'expression du BDNF ne varie pas, les régulations des récepteurs observées dans le shell vont dans le sens d'une activation de la voie. Il est donc probable que le sevrage à long terme à la morphine augmente globalement la signalisation BDNF-TrkB dans le Nac, mais par des mécanismes différents selon la sous-région étudiée. Cependant, aucune variation dans le ratio pCREB/CREB(T) n'a été observée dans le shell.

Des rôles différents ont été attribués au core et au shell lors de l'abstinence après auto-administration de cocaïne chez le rat au regard des variations de BDNF. Une augmentation de BDNF avait ainsi été observée dans le Nac entier au 45^{ème} jour de sevrage après auto-administration de cocaïne chez le rat, par rapport à des animaux contrôles. En distinguant les 2 sous-régions, il est apparu que l'augmentation du BDNF à ce temps de sevrage était seulement attribuée au core et non au shell du Nac. Ce n'est qu'au 90^{ème} jour d'abstinence qu'une augmentation de BDNF a été observée dans le shell (Li et al., 2013). Dans leurs conditions expérimentales, le BDNF dans le core atténuerait la recherche de cocaïne au début du sevrage tandis que l'augmentation plus tardive du BDNF dans le shell participerait au phénomène d'incubation du craving. Il est donc probable que dans nos conditions, une augmentation plus tardive du BDNF dans le shell soit également observée.

Il ne faut également pas perdre de vue que les analyses des différentes protéines sont faites sur des homogénats de tissus. Aussi, aucune distinction cellulaire et subcellulaire n'est ici réalisée. On ignore par exemple si le BDNF est majoritairement intracellulaire, stocké dans des vésicules et en attente de libération lors d'un potentiel d'action, ou bien s'il est extracellulaire et prêt à activer ses récepteurs. On ignore également si les régulations des récepteurs observées dans nos conditions concernent des récepteurs exprimés à la surface de la membrane ou bien si elle concerne une réserve de récepteurs prêts à être exprimés à la membrane, ou qui viennent d'être internalisés. L'étude de Li et ses collaborateurs précédemment citée représente une bonne illustration de cet argument : alors

qu'aucune régulation du récepteur TrkB phosphorylé n'était relevée dans un homogénat de Nac entier au 90^{ème} jour de sevrage entre les rats s'étant auto-administrés la cocaïne et les rats contrôles, la distinction de la protéine phosphorylée en surface, par biotinylation, a montré une expression à la membrane augmentée chez les rats cocaïne par rapport aux rats contrôles (Li et al., 2013).

La mémoire neurochimique des injections :

En comparant l'heure à laquelle les animaux avaient l'habitude de recevoir une injection et une autre heure de la journée au cours du sevrage, plusieurs informations peuvent être dégagées. Cette comparaison chez les animaux n'ayant reçu qu'un traitement chronique avec un véhicule non toxique, la solution saline, peut nous renseigner sur la conséquence et la rémanence des effets du stress de ces injections sur l'activation ou la répression de la voie du BDNF-TrkB dans le Nac. L'absence de régulation de la voie n'exclut cependant pas un éventuel effet du stress dans nos conditions expérimentales, pouvant se traduire par d'autres variations de protéines.

Chez les rats traités pendant 14 jours avec la solution saline, aucune variation de la voie du BDNF-TrkB n'est observée dans le core au 14^{ème} jour d'arrêt du traitement, en comparant l'heure habituelle d'injection de saline et une autre heure dans la journée. Plusieurs hypothèses peuvent être émises concernant cette absence de variation : soit notre protocole de traitement n'engendre pas de stress chez les animaux, soit il existe un stress dans nos conditions expérimentales mais (1) le Nac core n'y est pas sensible dans nos conditions ou (2) la voie du BDNF-TrkB n'est pas modulée par ce stress ou bien (3) l'effet du stress est présent et régule la voie du BDNF mais ne perdure pas après 14 jours d'arrêt des injections. Dans ce dernier cas, l'analyse au 1^{er} jour d'arrêt des traitements (expériences en cours) nous apportera cette information.

Dans le Nac shell cependant, un effet persistant est relevé : une forte augmentation de BDNF mature est observée à l'heure habituelle d'injection de solution saline, par rapport à une autre heure de la journée. Il s'agit d'un effet spontané, qui survient 14 jours après l'arrêt d'injections chroniques de solution saline. Aucune autre protéine de la voie de signalisation n'est altérée. Le Nac shell semble donc sensible au souvenir de l'effet aigu du stress lors des injections. Des augmentations de BDNF dans le Nac après un protocole de stress chez des animaux ont déjà été rapportées dans la littérature (Krishnan et al., 2007). Quel est l'origine de ce BDNF dont on observe une augmentation de l'expression à l'heure habituelle d'injection de solution saline ? Le shell reçoit des afférences de l'hippocampe dorsal et ventral, or plusieurs études ont montré une augmentation de BDNF dans l'hippocampe lorsque des animaux sont soumis à un stress chronique ou aigu (Shi et al., 2010;

Vollmayr et al., 2001). Il est donc possible que le BDNF provienne d'une autre région cérébrale comme l'hippocampe.

A l'heure habituelle d'injection, aucun effet du stress sur la signalisation du BDNF n'a été observé dans le core chez les animaux traités à la solution saline. Aussi, ce qui est observé avec la morphine dans cette sous-région reflète donc uniquement les conséquences du traitement pharmacologique à long terme. A l'heure habituelle d'injection de morphine, une augmentation de l'expression de BDNF mature et de proBDNF est observée par rapport à une autre heure de la journée. Aucune régulation du tPA à l'heure habituelle d'injection n'a été observée, mais cela n'exclut pas son intervention dans le processus de maturation du BDNF. En effet, une augmentation basale du tPA a été observée chez les animaux traités à la morphine, par rapport au taux basal de tPA des animaux contrôles. Il est donc possible d'imaginer une libération extracellulaire d'une réserve intracellulaire de tPA à l'heure habituelle d'injection de morphine sous l'effet d'un potentiel d'action, et ce dernier participerait à la maturation du proBDNF en BDNF mature. Parallèlement, une augmentation des récepteurs TrkB.T1 a été observée également dans le core à l'heure habituelle d'injection de morphine.

Dans le shell, le souvenir des injections de solution saline provoque une augmentation de la protéine mature de BDNF à l'heure habituelle d'injection par rapport au taux basal, alors qu'aucune régulation n'est observée avec la morphine entre l'heure habituelle d'injection et le taux basal de BDNF. Cela peut signifier que l'effet du stress est inhibé par la morphine dans le Nac shell. Contrairement au core où une augmentation des récepteurs tronqués est observée, dans le shell, l'expression des récepteurs tronqués diminue à l'heure habituelle d'injection de morphine. Si ce récepteur joue une nouvelle fois son rôle de dominant négatif, une diminution de son expression présage plutôt une activation de la voie de signalisation.

OBJECTIF 2 : ÉTUDE DES MODIFICATIONS DES NEUROTRANSMETTEURS DOPAMINE, GLUTAMATE ET GABA INDUITES APRÈS UN TRAITEMENT CHRONIQUE À LA MORPHINE

Les résultats précédemment discutés montrent en particulier des régulations d'expressions de différents composants de la voie BDNF-TrkB dans le Nac core entre les animaux contrôles et les animaux traités à la morphine. Des altérations entre l'heure où les animaux avaient l'habitude de recevoir la drogue et une autre heure de la journée (taux de base) ont également été mises en évidence.

Les données de la littérature montrent clairement un lien entre le BDNF et la plasticité neuronale, induite par l'exposition à des drogues. Ce lien peut se faire par différentes voies et afin d'étudier le rôle que le BDNF peut avoir dans les effets observés dans nos conditions expérimentales, nous avons dans un premier temps étudié par microdialyse intracérébrale les libérations de dopamine, glutamate et GABA dans le Nac core. En effet, les récepteurs TrkB sont présents sur les 3 types de neurones et l'activation de la cascade de signalisation BDNF-TrkB peut moduler la libération des neurotransmetteurs. De plus, les données précédentes du laboratoire montraient des **augmentations spontanées de dopamine** dans le Nac au 1^{er} et 14^{ème} jour de sevrage **à l'heure habituelle d'injection de cocaïne** par rapport à une autre heure dans la journée, après 14 jours de traitement (1 fois par jour, 20mg/kg, i.p.) (Puig et al., 2012).

Qu'en est-il avec une autre drogue, la morphine ? D'autres systèmes en dehors du système dopaminergique sont-ils altérés ?

La microdialyse intracérébrale en association avec une détection des neurotransmetteurs par spectrométrie de masse a permis de répondre aux questions de cet objectif. La méthodologie utilisée pour aboutir aux résultats est présentée ci-après.

Résumé des résultats obtenus dans l'objectif 2 :

	WD1			WD14		
	DA	Glu	GABA	DA	Glu	GABA
Morphine versus saline	=	=	=	↗	=	=
Saline Heure d'injection versus taux de base	=	=	=	=	=	=
Morphine Heure d'injection versus taux de base	↗	=	=	↗	=	=

Tableau 4: Bilan des résultats neurochimiques au 1^{er} et 14^{ème} jour de sevrage

DA : dopamine, Glu : glutamate, ↗ : p<0.05

révèlent plutôt une diminution de la dopamine. Néanmoins, il faut souligner que ces études utilisent des protocoles avec un sevrage précipité par la naloxone, un antagoniste des récepteurs μ . La naloxone entraîne des syndromes de sevrage très forts. Aussi, la diminution de la dopamine observée dans ces études est peut-être liée à un état émotionnel négatif provoqué par les signes de sevrage. Par exemple, l'étude de Espejo et ses collaborateurs montre une diminution de dopamine après prélèvement du Nac après sevrage précipité suite à l'implantation pendant 7 jours de pastilles de morphine chez le rat (Espejo et al., 2001). Cependant, Georges et ses collaborateurs ont montré qu'après 15 jours de sevrage (non précipité par la naloxone) après un traitement chronique à la morphine via l'implantation de pastilles de morphine, l'activité des neurones dopaminergiques de l'ATV des rats traités n'était pas différente des rats naïfs (Georges et al., 2006).

Dans une autre étude, après auto-administration d'héroïne, une augmentation progressive du comportement de recherche de drogue a été observée : si au 1^{er} jour d'abstinence, aucune différence n'est relevée, au 14^{ème} jour d'abstinence, une augmentation des appuis précédemment associés à l'obtention d'une injection d'héroïne est observée par rapport au 1^{er} jour de sevrage. Il s'agit de l'incubation du craving pour l'héroïne modélisé chez l'animal (Kuntz et al., 2008). Dans la mesure où la dopamine endogène du Nac a été liée à l'incubation du craving à la cocaïne (Saunders et al., 2013; Xi et al., 2013), il est possible que l'augmentation de dopamine observée dans nos conditions soit également le reflet d'une incubation du craving à la morphine. Ceci reste néanmoins une hypothèse car seul un protocole d'auto-administration de morphine, permettant la mesure directe de la recherche de drogue, permettrait de vérifier le lien entre l'augmentation progressive de dopamine au cours du sevrage à la morphine et l'incubation du craving.

Dans un protocole de réinstallation du comportement de prise d'héroïne, une augmentation de glutamate dans le Nac core a été observée. En revanche, chez des animaux ayant reçu la même quantité d'héroïne, mais de façon passive, par des injections non contingentes, aucune variation dans le taux de glutamate n'est relevée lors du protocole de réinstallation (LaLumière and Kalivas, 2008). Si la balance GABA/glutamate n'est pas altérée dans notre protocole, il n'est cependant pas impossible que des réarrangements au niveau des récepteurs se soient mis en place, conduisant ainsi à une modification de la signalisation intracellulaire. Une augmentation de l'expression du récepteur GABA_A a par exemple été reportée lors du sevrage à la morphine dans le locus coeruleus (Heikkilä et al., 2001). D'autre part, les études relatant des augmentations neurochimiques de GABA et glutamate extracellulaires lors du sevrage utilisent des protocoles avec des doses de morphine supérieures à celle utilisée dans notre protocole, ce qui pourrait expliquer l'absence de variation de ces neurotransmetteurs dans nos conditions expérimentales.

La mémoire neurochimique des injections :

Chez les animaux traités à la solution saline pendant 14 jours, aucun des 3 neurotransmetteurs n'est altéré entre l'heure habituelle d'injection de solution saline et une autre heure dans la journée. Cependant, une tendance est observée pour la dopamine extracellulaire : bien que cela ne soit pas significatif, le taux extracellulaire de dopamine semble augmenter à l'heure habituelle d'injection de solution saline, par rapport à une autre heure de la journée. Il est probable que les 14 jours d'injections forcées aient provoquées un stress conditionné à l'heure d'injection. Il a en effet déjà été montré que le stress provoquait une libération centrale de dopamine (Stevenson and Gratton, 2003).

En revanche, au 1^{er} et au 14^{ème} jour de sevrage, spécifiquement à l'heure habituelle des injections de morphine, une augmentation significative de dopamine, mais pas de GABA ou de glutamate, est observée dans le Nac core. Avec un protocole de traitement similaire, notre laboratoire avait montré une augmentation de dopamine dans le Nac core, au 1^{er} et au 14^{ème} jour de sevrage à l'heure habituelle d'injection de cocaïne (Puig et al., 2012). Ces augmentations spontanées de dopamine suggèrent l'existence d'un apprentissage entre l'obtention d'une récompense (l'injection de cocaïne ou de morphine) et l'heure à laquelle cette récompense est obtenue. La réponse dopaminergique provoquée par les injections de morphine se transfère de façon graduelle vers des indices associés à la prise, ici en l'occurrence, l'heure régulière d'injection des drogues, qui va servir de prédicteur de l'obtention de la récompense. Des études d'imagerie fonctionnelle chez l'homme ont également montré une activation du Nac lors de l'anticipation des récompenses (Abler et al., 2006).

L'originalité de ces résultats réside dans le caractère spontané du phénomène car aucun indice n'est présenté ici aux animaux. Cela signifie que l'heure à laquelle les traitements sont réalisés est un paramètre important à prendre en compte dans l'interprétation des résultats.

Plusieurs interrogations demeurent néanmoins : jusqu'à quel moment du sevrage ces augmentations spontanées de dopamine perdurent-elles ? L'augmentation spontanée de dopamine est-elle spécifique des drogues ou est-elle également observée avec une récompense naturelle ? Une étude a en effet montré que des rats ayant appris à recevoir de l'éthanol ou de la saccharine via un conditionnement opérant montrent une anticipation de l'accès à un renforcement positif lorsqu'ils sont remis dans le contexte de la prise habituelle 15 minutes avant de pouvoir recevoir les récompenses. Cela se traduit par une augmentation de dopamine extracellulaire dans le Nac par rapport aux contrôles respectifs (Weiss et al., 1993).

Ces augmentations spontanées de dopamine dans le Nac participent-elle au processus de la vulnérabilité à la rechute ? Enfin, dans quelle mesure le rythme circadien intervient-il dans ces

OBJECTIF 3 : ÉTUDE DES MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES DES NEURONES DU NOYAU ACCUMBENS INDUITES PAR UN TRAITEMENT CHRONIQUE À LA MORPHINE

RÉSUMÉ DE L'ARTICLE 1

(En préparation)

Modifications temporelles de la densité des épines dendritiques dans les sous-régions du noyau accumbens : comment le stress et la morphine modulent de façon différente la plasticité ?

Les résultats des expériences menées dans cet article montrent que le stress et la morphine régulent différemment la plasticité synaptique et en particulier les épines dendritiques dans les sous-régions du Nac.

Après 14 jours de traitement, consistant en des injections soit de solution saline, soit de morphine (1 fois par jour, 5mg/kg, s.c), réalisées tous les jours à la même heure chez le rat, une diminution des épines dendritiques est observée dans le Nac core à l'heure habituelle d'injection, par rapport à une autre heure dans la journée le 15^{ème} jour, soit 1 jour après l'arrêt des traitements. Dans le shell, le traitement à la solution saline provoque une augmentation des épines dendritiques à l'heure habituelle d'injection, un effet opposé à ce qui est observé dans le core, tandis qu'avec la morphine, aucune différence n'est relevée.

Après surrénalectomie, le traitement à la solution saline n'a plus d'effet sur les épines dendritiques quel que soit la sous-région du Nac étudiée, suggérant qu'un traitement chronique via des injections passives chez l'animal provoque un stress qui influe spontanément sur la densité des épines dendritiques, même après l'arrêt des injections. En enlevant l'effet du stress chez les animaux traités à la morphine, une augmentation des épines dendritiques est observée dans le core, tandis que le shell reste insensible aux injections de morphine.

L'ensemble de ces données tend à montrer l'importance du stress des injections sur la plasticité neuronale. Il est donc important de distinguer, lors d'expériences comportant un protocole d'injections passives chez l'animal, l'effet propre du stress et l'effet pharmacologique du produit injecté. L'heure à laquelle est effectuée les traitements est également un paramètre non négligeable à prendre en compte, cette fenêtre de temps constituant le siège d'une plasticité qui est évidente même après l'arrêt des traitements.

paralleled basal corticosterone level. As observed in our study, depletion of circulating corticosterone by adrenalectomy suppressed the corticosterone-induced alterations of dendritic spines. Interestingly this effect may be reversed by corticosterone supplementation (Ikeda et al., 2015). In morphine-treated rats we observed a significant decrease in dendritic spine density in Nac core at the usual hour of injection when compared to another time of the day. As these results were similar to those obtained with saline, this may mirror the anticipation of the acute effects of a conditioned-stress induced by the injection itself. However, in morphine-treated rats, the adrenalectomy revealed the pharmacological effect of the drug on dendritic spines, without stress as a confounding factor. Thus, the anticipation of the withdrawal-induced negative affect of morphine produces an increase in dendritic spine density at the usual hour of injection compared to another time of the day. There are some discrepancies in the literature regarding morphine-induced alterations of dendritic spines in the brain. Kobrin and colleagues found an increase of spine density in the core of the Nac of morphine-treated mice, while administration of morphine in a place preference paradigm did not (Kobrin et al., 2015). Accordingly, in another study, mice chronically treated with morphine and withdrawn for 2 months presented an increase of dendritic spine density in the Nac and cortex. This was paralleled by an increase in cortex and midbrain of Shank1, a protein well known to promote spine maturation and growth (Pal and Das, 2013). When comparing dendritic spine density in second order dendrites in subregions of Nac, Diana and colleagues found a decrease of dendritic spines density in shell on withdrawal day 1, 3 and 7 after 14 days of chronic treatment with morphine. Chronic morphine *per se* did not induce any alterations of dendritic spine density in both subregions (Diana et al., 2006; Spiga et al., 2005).

Compared to Nac core, opposite alterations in Nac shell were observed in saline-treated rats. At the usual hour of injection, there was an increase of dendritic spine density compared to another hour of the day. As previously discussed in Nac core, this may also traduce the acute effect of the conditioned-stress by chronic injection, as no more alterations were reported in adrenalectomized rats. Thus, the whole Nac seems sensitive to acute stress, although the 2 subregions, core and shell, respond in an opposite manner. Finally, morphine treatment blunted the increase of dendritic spine in Nac shell at the usual hour of injection previously observed in saline treated animals. Thus, in the shell, morphine may produce counter-adaptations in order to inhibit the stress-induced plasticity triggered by the injection. When adrenal glands were removed, morphine had no longer effect on plasticity in the Nac shell, at the usual hour of morphine injection compared to the basal level, suggesting that the core is more sensitive to the pharmacological effect of morphine than the shell. It is not the first time that a core-shell dichotomy of Nac is reported. In cocaine-treated mice, 24 hours after the last injection, dendritic spine density was reduced in the

core but increased in the shell when considering proximal dendrites (Dumitriu et al., 2012). Data in the literature, generally demonstrated more enduring changes in Nac core, establishing that Nac shell is preferentially involved in the development of addiction while the core is more implicated in long-lasting drug-induced plasticity. This dichotomy could also be explained by the differences in the afferent connections (Meredith et al., 1992). The shell receives limbic inputs from the basolateral amygdala and the ventral subiculum and the core receives inputs from the basolateral amygdala and parahippocampal regions.

Altogether, the present findings highlight that chronic saline injection induces a conditioned stress that alters dendritic spine density in the whole Nac at the usual hour of injection even in the absence of any injection. Thus when animals received repeated administration of a drug injection, one has to take into account that the results observed are the consequence of both drug pharmacological effect and injection effect. Further studies are warranted to determine which molecular pathways are involved in such stress-induced plasticity and in what extent the alterations of plasticity in both nucleus accumbens subregions are linked.

OBJECTIF 4 : LE BDNF POURRAIT-IL ÊTRE UN BON BIOMARQUEUR DE LA RECHUTE ? ÉTUDE PRÉLIMINAIRE SUR LES VARIATIONS PÉRIPHÉRIQUES DE BDNF APRÈS DIFFÉRENTS TRAITEMENTS

L'ensemble des résultats obtenus au niveau central dans le Nac a montré l'importance de considérer les neuroadaptations spontanées qui se mettent en place au cours du sevrage au moment où les animaux avaient l'habitude de recevoir une injection par rapport à une autre heure de la journée. Dans la mesure où le BDNF traverse la BHE, il peut être retrouvé en périphérie et son expression y est fortement perturbée dans les maladies psychiatriques.

Ce dernier objectif est une étude préliminaire qui vise à déterminer (1) si les modifications centrales de BDNF observées sont retrouvées en périphérie et (2) si ces altérations sont spécifiques des drogues ou bien plutôt liées à la mémoire de l'obtention d'un renforçant positif (drogue ou récompense naturelle). Si des modifications spécifiques des drogues sont démontrées, la perspective de ce travail serait de mettre en place un modèle d'addiction chez l'animal afin d'étudier les variations de BDNF périphérique à l'heure habituelle d'auto-administration de drogue. S'il existe un conditionnement à l'heure habituelle d'injection de drogues qui perdure dans le temps au cours de l'abstinence, il se pourrait que le BDNF soit un bon candidat biomarqueur pour objectiver une vulnérabilité à la rechute dans cette fenêtre de temps bien précise.

RÉSUMÉ DE L'ARTICLE 2

(Publié dans *International Journal of Neuropsychopharmacology*)

Régulation temporelle des taux de BDNF périphérique lors du sevrage à la morphine et à la cocaïne : comparaison avec une récompense naturelle

Les résultats de cet article ont démontré que le BDNF était régulé de manière différente selon le traitement proposé : cocaïne (20mg/kg, i.p.), morphine (5mg/kg, s.c) ou récompense naturelle (4g de gâteaux gras et sucrés, per os). En effet, au 1^{er} et 14^{ème} jour de sevrage après un traitement chronique à la cocaïne pendant 14 jours, une diminution du BDNF plasmatique est observée par rapport aux animaux contrôles, traités avec la solution saline. Avec la morphine, alors qu'aucune différence n'est relevée en début de sevrage, une augmentation progressive est observée au 14^{ème} jour de sevrage. Enfin, avec une récompense naturelle, une augmentation de BDNF plasmatique est observée au 1^{er} jour de sevrage, une altération probablement liée à une réponse métabolique et qui ne perdure pas dans le temps.

Un des résultats clé de l'article réside dans la spécificité des variations de BDNF périphérique à l'heure habituelle d'injection des drogues (cocaïne et morphine) par rapport à une autre heure de la journée (taux basal). En effet, au 1^{er} et 14^{ème} jour de sevrage, se produisent de façon spontanée des augmentations de BDNF plasmatique aux heures où les animaux recevaient l'injection de drogues, par rapport à une autre heure dans la journée. En revanche, avec la récompense naturelle, aucune variation n'est reportée. Ce phénomène, qui n'est donc pas qu'un « simple » reflet d'une mémoire associative suggère que l'heure habituelle d'injection pourrait constituer une fenêtre de temps pendant laquelle les individus seraient plus vulnérables à la rechute, et ce phénomène pourrait être quantifiable objectivement via une mesure du taux périphérique de BDNF, un biomarqueur potentiel.

Discussion générale et perspectives

“Ceux qui prétendent détenir la vérité sont ceux qui ont abandonné la poursuite du chemin vers elle. La vérité ne se possède pas, elle se cherche ».

Albert Jacquard

La mémoire des injections

Nous avons vu précédemment que l'anticipation chez les animaux avait lieu quel que soit la nature de la récompense : une récompense naturelle peut induire une anticipation comportementale, qui peut se mesurer par une activité plus importante dans une roue (Mistlberger, 2009). Au niveau biochimique, le processus semble différent car avec une récompense naturelle, aucune variation de BDNF plasmatique n'a été relevée au 1^{er} et 14^{ème} jour d'arrêt de la présentation d'une récompense naturelle (Geoffroy et al., 2014).

Chez les animaux traités à la solution saline, une augmentation non significative de la dopamine extracellulaire a été observée, alors qu'une diminution des épines dendritiques a été relevée à l'heure habituelle d'injection au 1^{er} jour d'arrêt des traitements dans le Nac core. Il semble donc peu probable que la dopamine intervienne dans le phénomène de plasticité observée. Pourtant, il a été montré que le stress activait sélectivement la transmission dopaminergique dans le Nac (Abercrombie et al., 1989). Il est probable que dans nos conditions expérimentales (1) le stress de manipulation et d'injection ne soit pas suffisant pour modifier la transmission dopaminergique ou que (2) la transmission dopaminergique soit en effet altérée pendant le traitement mais ne perdure pas après l'arrêt du traitement. Les analyses de la signalisation du BDNF-TrkB dans les 2 sous-régions du Nac au 1^{er} jour de sevrage pourront amener des informations sur le lien entre le stress et le BDNF.

Au 1^{er} jour de sevrage dans le shell, une augmentation des épines dendritiques à l'heure habituelle d'injection de solution saline a été observée, par rapport au taux basal, et un traitement chronique à la morphine masque les effets du stress dans cette région car aucune variation dans la densité des épines dendritiques n'est observée avec la morphine. Au 14^{ème} jour de sevrage, une augmentation de BDNF mature dans le shell a été observée chez les rats traités à la solution saline à l'heure habituelle d'injection, par rapport à une autre heure de la journée. Avec la morphine, aucune altération n'a été relevée dans le taux de BDNF. La morphine masque-t-elle également l'effet du stress en normalisant le taux de BDNF mature dans le Nac ? C'est une hypothèse qui pourrait être vérifiée en observant la voie du BDNF-TrkB dans le Nac après un traitement chronique à la morphine chez des animaux surrénalectomisés. Plusieurs études ont en effet montré un lien entre le stress et le taux de BDNF. Par exemple un stress de défaite sociale chez la souris augmente l'excitabilité des neurones de l'ATV et augmente le taux de BDNF dans le Nac (Nikulina et al., 2014; Revest et al., 2014).

Chez les animaux traités à la morphine, des augmentations de dopamine extracellulaire, de proBDNF et de BDNF mature ont été observées dans le Nac core, mais le phénomène semble ici indépendant du tPA car aucune variation de la protéine n'a été observée. Ainsi, il est probable que les taux de

pronostique d'une rechute imminente chez les toxicomanes, dans le but d'adapter leur prise en charge thérapeutique au cours de la journée. Il est cependant possible que les modifications de BDNF observées dans nos conditions expérimentales présentes ne soient pas retrouvées avec des administrations contingentes de drogues.

Des altérations dans le taux de BDNF sont observées dans beaucoup de maladies psychiatriques, comme dans la schizophrénie par exemple (Nurjono et al., 2012), et ne sont donc pas restreintes à l'addiction. Même en étudiant une pathologie ciblée, comme l'addiction à la cocaïne, les études divergent à cause des facteurs confondants. Les poly-consommations, la comorbidité, ou encore la prise de traitements de substitutions rendent les interprétations des variations observées difficiles. Est-il donc possible que le BDNF soit le biomarqueur de la rechute de demain ? Peut-être faudrait-il se concentrer sur la recherche de combinaisons de biomarqueurs pour cibler la maladie ? Le taux périphérique de BDNF pourrait éventuellement être associé à un marqueur de l'inflammation, comme des interleukines (Frank et al., 2011; Heberlein et al., 2014; Narvaez et al., 2013; Zhou et al., 2014). Dans la dépression le taux de BDNF a été associé au taux de corticostérone (Blugeot et al., 2011).

Enfin, il nous est arrivé au cours de ces travaux de thèse d'observer des variabilités interindividuelles dans la réponse à un même traitement pharmacologique. L'existence de populations répondant différemment au sein d'un même groupe pose question. Cela reflète-t-il la différence de vulnérabilité aux drogues, reportée chez l'homme ? L'étude du comportement dans l'addiction semble pour cela indispensable, et de nombreux travaux caractérisent déjà des endophénotypes qui prédisent certains comportements (Belin-Rauscent et al., 2016). Mais quel est l'origine de ces endophénotypes ?

Depuis quelques années, le microbiote a suscité un grand intérêt auprès de la communauté scientifique. Il a été montré que certains patients alcoolo-dépendants avaient une augmentation de la perméabilité intestinale et une altération de la composition de leur microbiote intestinal. Ces patients présentaient un score plus important pour la dépression, l'anxiété, et le craving à l'alcool à la fin du programme de détoxification. Les auteurs émettent donc l'hypothèse d'une communication cerveau-intestin dans la dépendance à l'alcool, avec notamment une perturbation du microbiote intestinal qui influencerait la sévérité des comportements de dépendance (Leclercq et al., 2014). Notre microbiote influence-t-il notre réponse et notre vulnérabilité aux drogues ? L'apport de certains probiotiques peut-elle influencer certains comportements liés à l'addiction ?

Des comportements altérés sont également relevés chez des souris axéniques. Chez ces animaux, en leur implantant un microbiote d'une autre souris, il a été montré qu'elles présentaient alors le comportement social de la souris donneuse (pour revue voir De Palma et al., 2015; Wong et al.,

2015). La variabilité interindividuelle peut-elle s'expliquer par la différence de composition du microbiote ? Des études à grande échelle seraient nécessaires pour répondre à ces questions (Montiel-Castro et al., 2013).

Bibliographie

« Une citation sans références est à peu près aussi utile qu'une horloge sans aiguilles. »

Paul Desalmand

- K  ppers, E., and Beyer, C. (2001b). Dopamine regulates brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in cultured embryonic mouse striatal cells. *Neuroreport* 12, 1175–1179.
- Kwintner, D.M., Lo, K., Mafi, P., and Silverman, M.A. (2009). Dynactin regulates bidirectional transport of dense-core vesicles in the axon and dendrites of cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 162, 1001–1010.
- LaForge, K.S., Yuferov, V., and Kreek, M.J. (2000). Opioid receptor and peptide gene polymorphisms: potential implications for addictions. *Eur. J. Pharmacol.* 410, 249–268.
- Lai, K.-O., and Ip, N.Y. (2013). Structural plasticity of dendritic spines: The underlying mechanisms and its dysregulation in brain disorders. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1832, 2257–2263.
- LaLumiere, R.T., and Kalivas, P.W. (2008). Glutamate Release in the Nucleus Accumbens Core Is Necessary for Heroin Seeking. *J. Neurosci.* 28, 3170–3177.
- Lambert, D.G. (2008). The nociceptin/orphanin FQ receptor: a target with broad therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 7, 694–710.
- Lang, T., Bruns, D., Wenzel, D., Riedel, D., Holroyd, P., Thiele, C., and Jahn, R. (2001). SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *EMBO J* 20, 2202–2213.
- Lang, U.E., Sander, T., Lohoff, F.W., Hellweg, R., Bajbouj, M., Winterer, G., and Gallinat, J. (2007). Association of the met66 allele of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) with smoking. *Psychopharmacology (Berl.)* 190, 433–439.
- Larson, E.B., Graham, D.L., Arzaga, R.R., Buzin, N., Webb, J., Green, T.A., Bass, C.E., Neve, R.L., Terwilliger, E.F., Nestler, E.J., et al. (2011). Overexpression of CREB in the nucleus accumbens shell increases cocaine reinforcement in self-administering rats. *J. Neurosci.* 31, 16447–16457.
- Lau, A.G., Irier, H.A., Gu, J., Tian, D., Ku, L., Liu, G., Xia, M., Fritsch, B., Zheng, J.Q., Dingledine, R., et al. (2010). Distinct 3'UTRs differentially regulate activity-dependent translation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 15945–15950.
- Leclercq, S., Matamoros, S., Cani, P.D., Neyrinck, A.M., Jamar, F., St  rkel, P., Windey, K., Tremaroli, V., B  ckhed, F., Verbeke, K., et al. (2014). Intestinal permeability, gut-bacterial dysbiosis, and behavioral markers of alcohol-dependence severity. *PNAS* 111, E4485–E4493.
- Lee, F.S., and Chao, M.V. (2001). Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3555–3560.
- Lee, B., Sur, B.-J., Shim, I., Hahm, D.-H., and Lee, H. (2014). Acupuncture Stimulation Attenuates Impaired Emotional-Like Behaviors and Activation of the Noradrenergic System during Prolonged Abstinence following Chronic Morphine Exposure in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014, 216503.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K.K., and Hempstead, B.L. (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294, 1945–1948.
- Lefkowitz, R.J., and Shenoy, S.K. (2005). Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 308, 512–517.

- Leite-Morris, K.A., Kobrin, K.L., Guy, M.D., Young, A.J., Heinrichs, S.C., and Kaplan, G.B. (2014). Extinction of opiate reward reduces dendritic arborization and c-Fos expression in the nucleus accumbens core. *Behav. Brain Res.* 263, 51–59.
- Leri, F., Flores, J., Rajabi, H., and Stewart, J. (2003). Effects of cocaine in rats exposed to heroin. *Neuropsychopharmacology* 28, 2102–2116.
- Lessmann, V., and Brigadski, T. (2009). Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: an update. *Neurosci. Res.* 65, 11–22.
- Lhullier, A.C., Moreira, F.P., da Silva, R.A., Marques, M.B., Bittencourt, G., Pinheiro, R.T., Souza, L.D.M., Portela, L.V., Lara, D.R., Jansen, K., et al. (2015). Increased serum neurotrophin levels related to alcohol use disorder in a young population sample. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 39, 30–35.
- Li, T.K., Yin, S.J., Crabb, D.W., O’Connor, S., and Ramchandani, V.A. (2001). Genetic and environmental influences on alcohol metabolism in humans. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 25, 136–144.
- Li, X., DeJoseph, M.R., Urban, J.H., Bahi, A., Dreyer, J.-L., Meredith, G.E., Ford, K.A., Ferrario, C.R., Loweth, J.A., and Wolf, M.E. (2013). Different roles of BDNF in nucleus accumbens core versus shell during the incubation of cue-induced cocaine craving and its long-term maintenance. *J. Neurosci.* 33, 1130–1142.
- Lindvall, O., Björklund, A., and Divac, I. (1978). Organization of catecholamine neurons projecting to the frontal cortex in the rat. *Brain Res.* 142, 1–24.
- Lingford-Hughes, A., and Nutt, D. (2003). Neurobiology of addiction and implications for treatment. *The British Journal of Psychiatry* 182, 97–100.
- Liu, Q.-R., Walther, D., Drgon, T., Polesskaya, O., Lesnick, T.G., Strain, K.J., de Andrade, M., Bower, J.H., Maraganore, D.M., and Uhl, G.R. (2005). Human brain derived neurotrophic factor (BDNF) genes, splicing patterns, and assessments of associations with substance abuse and Parkinson’s Disease. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 134B, 93–103.
- Lou, H., Kim, S.-K., Zaitsev, E., Snell, C.R., Lu, B., and Loh, Y.P. (2005). Sorting and activity-dependent secretion of BDNF require interaction of a specific motif with the sorting receptor carboxypeptidase e. *Neuron* 45, 245–255.
- Lu, B., Pang, P.T., and Woo, N.H. (2005). The yin and yang of neurotrophin action. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 603–614.
- Lu, L., Dempsey, J., Liu, S.Y., Bossert, J.M., and Shaham, Y. (2004). A single infusion of brain-derived neurotrophic factor into the ventral tegmental area induces long-lasting potentiation of cocaine seeking after withdrawal. *J. Neurosci.* 24, 1604–1611.
- Lu, X.Y., Ghasemzadeh, M.B., and Kalivas, P.W. (1998). Expression of D1 receptor, D2 receptor, substance P and enkephalin messenger RNAs in the neurons projecting from the nucleus accumbens. *Neuroscience* 82, 767–780.
- Lunden, J.W., and Kirby, L.G. (2013). Opiate exposure and withdrawal dynamically regulate mRNA expression in the serotonergic dorsal raphe nucleus. *Neuroscience* 254, 160–172.
- Maldonado, R., Stinus, L., Gold, L.H., and Koob, G.F. (1992). Role of different brain structures in the expression of the physical morphine withdrawal syndrome. *J Pharmacol Exp Ther* 261, 669–677.

- Manzoni, O.J., and Williams, J.T. (1999). Presynaptic regulation of glutamate release in the ventral tegmental area during morphine withdrawal. *J. Neurosci.* *19*, 6629–6636.
- Marie, N., Lecoq, I., Jauzac, P., and Allouche, S. (2003). Differential Sorting of Human δ -Opioid Receptors after Internalization by Peptide and Alkaloid Agonists. *J. Biol. Chem.* *278*, 22795–22804.
- Marie, N., Canestrelli, C., and Noble, F. (2012). Transfer of neuroplasticity from nucleus accumbens core to shell is required for cocaine reward. *PLoS ONE* *7*, e30241.
- Martin, G., Przewlocki, R., and Siggins, G.R. (1999). Chronic morphine treatment selectively augments metabotropic glutamate receptor-induced inhibition of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotransmission in nucleus accumbens. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *288*, 30–35.
- Martin, G., Guadaño-Ferraz, A., Morte, B., Ahmed, S., Koob, G.F., De Lecea, L., and Siggins, G.R. (2004). Chronic morphine treatment alters N-methyl-D-aspartate receptors in freshly isolated neurons from nucleus accumbens. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *311*, 265–273.
- Martínez-Téllez, R.I., Hernández-Torres, E., Gamboa, C., and Flores, G. (2009). Prenatal stress alters spine density and dendritic length of nucleus accumbens and hippocampus neurons in rat offspring. *Synapse* *63*, 794–804.
- Martini, L., and Whistler, J.L. (2007). The role of mu opioid receptor desensitization and endocytosis in morphine tolerance and dependence. *Curr. Opin. Neurobiol.* *17*, 556–564.
- Martin-Zanca, D., Oskam, R., Mitra, G., Copeland, T., and Barbacid, M. (1989). Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene. *Mol. Cell. Biol.* *9*, 24–33.
- Mathews, G.C., and Diamond, J.S. (2003). Neuronal glutamate uptake Contributes to GABA synthesis and inhibitory synaptic strength. *J. Neurosci.* *23*, 2040–2048.
- Matsuda, N., Lu, H., Fukata, Y., Noritake, J., Gao, H., Mukherjee, S., Nemoto, T., Fukata, M., and Poo, M.-M. (2009). Differential activity-dependent secretion of brain-derived neurotrophic factor from axon and dendrite. *J. Neurosci.* *29*, 14185–14198.
- Matthes, H.W., Maldonado, R., Simonin, F., Valverde, O., Slowe, S., Kitchen, I., Befort, K., Dierich, A., Le Meur, M., Dollé, P., et al. (1996). Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* *383*, 819–823.
- Mazei-Robison, M.S., Koo, J.W., Friedman, A., Lansink, C.S., Robison, A.J., Vinish, M., Krishnan, V., Kim, S., Siuta, M.A., Galli, M.A., et al. (2011). Role for mTOR Signaling and Neuronal Activity in Morphine-Induced Adaptations in Ventral Tegmental Area Dopamine Neurons. *Neuron* *72*, 977–990.
- McKay, S.E., Garner, A., Caldero, J., Tucker, R.P., Large, T., and Oppenheim, R.W. (1996). The expression of trkB and p75 and the role of BDNF in the developing neuromuscular system of the chick embryo. *Development* *122*, 715–724.
- Meiser, J., Weindl, D., and Hiller, K. (2013). Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun. Signal* *11*, 34.
- Melchor, J.P., and Strickland, S. (2005). Tissue plasminogen activator in central nervous system physiology and pathology. *Thromb. Haemost.* *93*, 655–660.

- Melief, E.J., Miyatake, M., Bruchas, M.R., and Chavkin, C. (2010). Ligand-directed c-Jun N-terminal kinase activation disrupts opioid receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 11608–11613.
- Meredith, G.E., Agolia, R., Arts, M.P., Groenewegen, H.J., and Zahm, D.S. (1992). Morphological differences between projection neurons of the core and shell in the nucleus accumbens of the rat. *Neuroscience* *50*, 149–162.
- Merighi, A. (2002). Costorage and coexistence of neuropeptides in the mammalian CNS. *Progress in Neurobiology* *66*, 161–190.
- Merikangas, K.R., Stolar, M., Stevens, D.E., Goulet, J., Preisig, M.A., Fenton, B., Zhang, H., O'Malley, S.S., and Rounsaville, B.J. (1998). Familial transmission of substance use disorders. *Arch. Gen. Psychiatry* *55*, 973–979.
- Merriner, J.L., Becker, J.A.J., Befort, K., and Kieffer, B.L. (2009). Reward Processing by the Opioid System in the Brain. *Physiological Reviews* *89*, 1379–1412.
- Middlemas, D.S., Meisenhelder, J., and Hunter, T. (1994). Identification of TrkB autophosphorylation sites and evidence that phospholipase C-gamma 1 is a substrate of the TrkB receptor. *J. Biol. Chem.* *269*, 5458–5466.
- Minichiello, L. (2009). TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat. Rev. Neurosci.* *10*, 850–860.
- Miranda, C., Virgilio, M.D., Selleri, S., Zanotti, G., Pagliardini, S., Pierotti, M.A., and Greco, A. (2002). Novel Pathogenic Mechanisms of Congenital Insensitivity to Pain with Anhidrosis Genetic Disorder Unveiled by Functional Analysis of Neurotrophic Tyrosine Receptor Kinase Type 1/Nerve Growth Factor Receptor Mutations. *J. Biol. Chem.* *277*, 6455–6462.
- Missale, C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M., and Caron, M.G. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* *78*, 189–225.
- Mistlberger, R.E. (2009). Food-anticipatory circadian rhythms: concepts and methods. *European Journal of Neuroscience* *30*, 1718–1729.
- Mitchellmore, C., and Gede, L. (2014). Brain Derived Neurotrophic Factor: epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Brain Res.* *1586*, 162–172.
- Modarresi, F., Faghihi, M.A., Lopez-Toledano, M.A., Fatemi, R.P., Magistri, M., Brothers, S.P., van der Brug, M.P., and Wahlestedt, C. (2012). Natural Antisense Inhibition Results in Transcriptional De-Repression and Gene Upregulation. *Nat Biotechnol* *30*, 453–459.
- Monclaro, A.V., Sampaio, A.C., Ribeiro, N.B., and Barros, M. (2014). Time-of-day effect on a food-induced conditioned place preference task in monkeys. *Behav. Brain Res.* *259*, 336–341.
- Montagud-Romero, S., Aguilar, M.A., Maldonado, C., Manzanedo, C., Miñarro, J., and Rodríguez-Arias, M. (2015). Acute social defeat stress increases the conditioned rewarding effects of cocaine in adult but not in adolescent mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* *135*, 1–12.
- Montiel-Castro, A.J., González-Cervantes, R.M., Bravo-Ruiseco, G., and Pacheco-López, G. (2013). The microbiota-gut-brain axis: neurobehavioral correlates, health and sociality. *Front Integr Neurosci* *7*.

- Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B., and Seeburg, P.H. (1992). Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256, 1217–1221.
- Moore, C.A.C., Milano, S.K., and Benovic, J.L. (2007). Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu. Rev. Physiol.* 69, 451–482.
- Mowla, S.J., Pareek, S., Farhadi, H.F., Petrecca, K., Fawcett, J.P., Seidah, N.G., Morris, S.J., Sossin, W.S., and Murphy, R.A. (1999). Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 19, 2069–2080.
- Mowla, S.J., Farhadi, H.F., Pareek, S., Atwal, J.K., Morris, S.J., Seidah, N.G., and Murphy, R.A. (2001). Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J. Biol. Chem.* 276, 12660–12666.
- Müller, C.P., and Homberg, J.R. (2015). The role of serotonin in drug use and addiction. *Behav. Brain Res.* 277, 146–192.
- Muragaki, Y., Timothy, N., Leight, S., Hempstead, B.L., Chao, M.V., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1995). Expression of trk receptors in the developing and adult human central and peripheral nervous system. *J. Comp. Neurol.* 356, 387–397.
- Murray, F., Harrison, N.J., Grimwood, S., Bristow, L.J., and Hutson, P.H. (2007). Nucleus accumbens NMDA receptor subunit expression and function is enhanced in morphine-dependent rats. *Eur. J. Pharmacol.* 562, 191–197.
- Nagai, T., Yamada, K., Yoshimura, M., Ishikawa, K., Miyamoto, Y., Hashimoto, K., Noda, Y., Nitta, A., and Nabeshima, T. (2004a). The tissue plasminogen activator-plasmin system participates in the rewarding effect of morphine by regulating dopamine release. *PNAS* 101, 3650–3655.
- Nagai, T., Yamada, K., Yoshimura, M., Ishikawa, K., Miyamoto, Y., Hashimoto, K., Noda, Y., Nitta, A., and Nabeshima, T. (2004b). The tissue plasminogen activator-plasmin system participates in the rewarding effect of morphine by regulating dopamine release. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 3650–3655.
- Nagappan, G., Zaitsev, E., Senatorov, V.V., Yang, J., Hempstead, B.L., and Lu, B. (2009). Control of extracellular cleavage of ProBDNF by high frequency neuronal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 1267–1272.
- Nair-Roberts, R.G., Chatelain-Badie, S.D., Benson, E., White-Cooper, H., Bolam, J.P., and Ungless, M.A. (2008). Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience* 152, 1024–1031.
- Nakahashi, T., Fujimura, H., Altar, C.A., Li, J., Kambayashi, J., Tandon, N.N., and Sun, B. (2000). Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. *FEBS Lett.* 470, 113–117.
- Narvaez, J.C.M., Magalhães, P.V., Fries, G.R., Colpo, G.D., Czepielewski, L.S., Vianna, P., Chies, J.A.B., Rosa, A.R., Von Diemen, L., Vieta, E., et al. (2013). Peripheral toxicity in crack cocaine use disorders. *Neurosci. Lett.* 544, 80–84.
- Neal, M., Cunningham, J., Lever, I., Pezet, S., and Malsangio, M. (2003). Mechanism by which brain-derived neurotrophic factor increases dopamine release from the rabbit retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 791–798.

- Nedergaard, M., Takano, T., and Hansen, A.J. (2002). Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat. Rev. Neurosci.* *3*, 748–755.
- Nees, F., Witt, S.H., Dinu-Biringer, R., Lourdasamy, A., Tzschoppe, J., Vollstädt-Klein, S., Millenet, S., Bach, C., Poustka, L., Banaschewski, T., et al. (2015). BDNF Val66Met and reward-related brain function in adolescents: Role for early alcohol consumption. *Alcohol* *49*, 103–110.
- Nestler, E.J. (2005). Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat. Neurosci.* *8*, 1445–1449.
- Nicole, O., Docagne, F., Ali, C., Margaille, I., Carmeliet, P., MacKenzie, E.T., Vivien, D., and Buisson, A. (2001). The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat. Med.* *7*, 59–64.
- Niehaus, J.L., Murali, M., and Kauer, J.A. (2010). Drugs of Abuse and Stress Impair LTP at Inhibitory Synapses in the Ventral Tegmental Area. *Eur J Neurosci* *32*, 108–117.
- Nieto, M.M., Wilson, J., Cupo, A., Roques, B.P., and Noble, F. (2002). Chronic Morphine Treatment Modulates the Extracellular Levels of Endogenous Enkephalins in Rat Brain Structures Involved in Opiate Dependence: A Microdialysis Study. *J. Neurosci.* *22*, 1034–1041.
- Nikulina, E.M., Johnston, C.E., Wang, J., and Hammer, R.P. (2014). Neurotrophins in the ventral tegmental area : role in social stress, mood disorders and drug abuse. *Neuroscience* *282*, 122–138.
- Noble, F., and Cox, B.M. (1996). Differential desensitization of μ - and δ - opioid receptors in selected neural pathways following chronic morphine treatment. *British Journal of Pharmacology* *117*, 161–169.
- Noël, F., Iourgenko, V., Pouille, Y., and Hanoune, J. (1994). Approches moléculaires de l'action des opiacés. *MS. Médecine sciences* *10*, 1116–1126.
- Nugent, F.S., and Kauer, J.A. (2008). LTP of GABAergic synapses in the ventral tegmental area and beyond. *J Physiol* *586*, 1487–1493.
- Numakawa, T., Suzuki, S., Kumamaru, E., Adachi, N., Richards, M., and Kunugi, H. (2010). BDNF function and intracellular signaling in neurons. *Histol. Histopathol.* *25*, 237–258.
- Numan, S., Lane-Ladd, S.B., Zhang, L., Lundgren, K.H., Russell, D.S., Seroogy, K.B., and Nestler, E.J. (1998). Differential regulation of neurotrophin and trk receptor mRNAs in catecholaminergic nuclei during chronic opiate treatment and withdrawal. *J. Neurosci.* *18*, 10700–10708.
- Nurjono, M., Lee, J., and Chong, S.-A. (2012). A Review of Brain-derived Neurotrophic Factor as a Candidate Biomarker in Schizophrenia. *Clin Psychopharmacol Neurosci* *10*, 61–70.
- O'Brien, C.P., Childress, A.R., McLellan, A.T., and Ehrman, R. (1992). Classical conditioning in drug-dependent humans. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *654*, 400–415.
- O'Brien, C.P., Volkow, N., and Li, T.-K. (2006). What's in a Word? Addiction Versus Dependence in DSM-V. *AJP* *163*, 764–765.
- Offenhäuser, N., Muzio, V., and Biffo, S. (2002). BDNF binding to truncated trkB.T1 does not affect gene expression. *Neuroreport* *13*, 1189–1193.

- Ohira, K., and Hayashi, M. (2009). A New Aspect of the TrkB Signaling Pathway in Neural Plasticity. *Curr Neuropharmacol* 7, 276–285.
- Okura, T., Saito, M., Nakanishi, M., Komiyama, N., Fujii, A., Yamada, S., and Kimura, R. (2003). Different distribution of morphine and morphine-6 beta-glucuronide after intracerebroventricular injection in rats. *Br. J. Pharmacol.* 140, 211–217.
- Olds, J., and Milner, P. (1954). Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 47, 419–427.
- ONDUC, Rapport mondial sur les drogues 2015, résumé analytique, Office des nations unies contre la drogue et le crime
- O’Shea, R.D. (2002). Roles and regulation of glutamate transporters in the central nervous system. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 29, 1018–1023.
- Ouzzine, M., Gulberti, S., Ramalanjaona, N., Magdalou, J., and Fournel-Gigleux, S. (2014). The UDP-glucuronosyltransferases of the blood-brain barrier: their role in drug metabolism and detoxication. *Front Cell Neurosci* 8.
- Pal, A., and Das, S. (2013). Chronic morphine exposure and its abstinence alters dendritic spine morphology and upregulates Shank1. *Neurochemistry International* 62, 956–964.
- Pan, W., Banks, W.A., Fasold, M.B., Bluth, J., and Kastin, A.J. (1998). Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. *Neuropharmacology* 37, 1553–1561.
- Pandey, S.C., Roy, A., and Mittal, N. (2001). Effects of Chronic Ethanol Intake and Its Withdrawal on the Expression and Phosphorylation of the CREB Gene Transcription Factor in Rat Cortex. *J Pharmacol Exp Ther* 296, 857–868.
- Pandey, S.C., Zhang, H., Ugale, R., Prakash, A., Xu, T., and Misra, K. (2008). Effector immediate-early gene arc in the amygdala plays a critical role in alcoholism. *J. Neurosci.* 28, 2589–2600.
- Pang, P.T., Teng, H.K., Zaitsev, E., Woo, N.T., Sakata, K., Zhen, S., Teng, K.K., Yung, W.-H., Hempstead, B.L., and Lu, B. (2004). Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 306, 487–491.
- Park, H., and Poo, M. (2013). Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 7–23.
- Park, J.J., Cawley, N.X., and Loh, Y.P. (2008). A Bi-directional Carboxypeptidase E - driven transport mechanism controls BDNF vesicle homeostasis in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 39, 63–73.
- Parpura, V., and Verkhratsky, A. (2012). Astrocytes revisited: concise historic outlook on glutamate homeostasis and signaling. *Croat Med J* 53, 518–528.
- Parpura, V., Basarsky, T.A., Liu, F., Jeftinija, K., Jeftinija, S., and Haydon, P.G. (1994). Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369, 744–747.
- Pasternak, G.W., Bodnar, R.J., Clark, J.A., and Inturrisi, C.E. (1987). Morphine-6-glucuronide, a potent mu agonist. *Life Sciences* 41, 2845–2849.

- Patel, M.B., Patel, C.N., Rajashekara, V., and Yoburn, B.C. (2002). Opioid agonists differentially regulate mu-opioid receptors and trafficking proteins in vivo. *Mol. Pharmacol.* *62*, 1464–1470.
- Pathan, H., and Williams, J. (2012). Basic opioid pharmacology: an update. *British Journal of Pain* *6*, 11–16.
- Pawlak, R., Rao, B.S.S., Melchor, J.P., Chattarji, S., McEwen, B., and Strickland, S. (2005). Tissue plasminogen activator and plasminogen mediate stress-induced decline of neuronal and cognitive functions in the mouse hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*, 18201–18206.
- Perkins, K.A., Briski, J., Fonte, C., Scott, J., and Lerman, C. (2009). Severity of tobacco abstinence symptoms varies by time of day. *Nicotine Tob Res* *11*, 84–91.
- Perrotti, L.I., Hadeishi, Y., Ulery, P.G., Barrot, M., Monteggia, L., Duman, R.S., and Nestler, E.J. (2004). Induction of Δ FosB in Reward-Related Brain Structures after Chronic Stress. *The Journal of Neuroscience* *24*, 10594–10602.
- Peters, J., and De Vries, T.J. (2012). Glutamate Mechanisms Underlying Opiate Memories. *Cold Spring Harb Perspect Med* *2*:a012088
- Petroff (2002). GABA and glutamate in the human brain. *Neuroscientist* *8*, 562–573.
- Petroff, Pan, J.W., and Rothman, D.L. (2002). Magnetic Resonance Spectroscopic Studies of Neurotransmitters and Energy Metabolism in Epilepsy. *Epilepsia* *43*, 40–50.
- Petryshen, T., Sabeti, P., Aldinger, K., Fry, B., Fan, J., Schaffner, S., Waggoner, S., Tahl, A., and Sklar, P. (2010). Population genetic study of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene. *Mol Psychiatry* *15*, 810–815.
- Pezawas, L., Verchinski, B.A., Mattay, V.S., Callicott, J.H., Kolachana, B.S., Straub, R.E., Egan, M.F., Meyer-Lindenberg, A., and Weinberger, D.R. (2004). The Brain-Derived Neurotrophic Factor val66met Polymorphism and Variation in Human Cortical Morphology. *J. Neurosci.* *24*, 10099–10102.
- Phelps, E.A., and LeDoux, J.E. (2005). Contributions of the Amygdala to Emotion Processing: From Animal Models to Human Behavior. *Neuron* *48*, 175–187.
- Piazza, P.V., and Le Moal, M.L. (1996). Pathophysiological basis of vulnerability to drug abuse: role of an interaction between stress, glucocorticoids, and dopaminergic neurons. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *36*, 359–378.
- Pin, J.P., and Duvoisin, R. (1995). The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* *34*, 1–26.
- Poduslo, J.F., and Curran, G.L. (1996). Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. *Mol. Brain Res.* *36*, 280–286.
- Pruunsild, P., Kazantseva, A., Aid, T., Palm, K., and Timmusk, T. (2007). Dissecting the human BDNF locus: Bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics* *90*, 397–406.
- Pu, L., Liu, Q., and Poo, M. (2006). BDNF-dependent synaptic sensitization in midbrain dopamine neurons after cocaine withdrawal. *Nat. Neurosci.* *9*, 605–607.

Puig, S. (2012). Thèse de doctorat. Etude intégrée des variations comportementales, neurochimiques et cellulaires de la cocaïne : Analyse des variations à court et à long terme : Importance du profil d'administration et anticipation de l'effet renforçant de la drogue (Paris 5).

Puig, S., Noble, F., and Benturquia, N. (2012). Short- and long-lasting behavioral and neurochemical adaptations: relationship with patterns of cocaine administration and expectation of drug effects in rats. *Transl Psychiatry* 2, e175.

Quello, S.B., Brady, K.T., and Sonne, S.C. (2005). Mood Disorders and Substance Use Disorder: A Complex Comorbidity. *Sci Pract Perspect* 3, 13–21.

Radley, J.J., Rocher, A.B., Miller, M., Janssen, W.G.M., Liston, C., Hof, P.R., McEwen, B.S., and Morrison, J.H. (2006). Repeated Stress Induces Dendritic Spine Loss in the Rat Medial Prefrontal Cortex. *Cereb. Cortex* 16, 313–320.

Rajagopal, R., Chen, Z.-Y., Lee, F.S., and Chao, M.V. (2004). Transactivation of Trk Neurotrophin Receptors by G-Protein-Coupled Receptor Ligands Occurs on Intracellular Membranes. *J. Neurosci.* 24, 6650–6658.

Rantamäki, T., Vesa, L., Antila, H., Di Lieto, A., Tammela, P., Schmitt, A., Lesch, K.-P., Rios, M., and Castrén, E. (2011). Antidepressant drugs transactivate TrkB neurotrophin receptors in the adult rodent brain independently of BDNF and monoamine transporter blockade. *PLoS ONE* 6, e20567.

Rasmussen, K., Beitner-Johnson, D.B., Krystal, J.H., Aghajanian, G.K., and Nestler, E.J. (1990). Opiate withdrawal and the rat locus coeruleus: behavioral, electrophysiological, and biochemical correlates. *J. Neurosci.* 10, 2308–2317.

Ren, Q., Ma, M., Yang, C., Zhang, J.-C., Yao, W., and Hashimoto, K. (2015). BDNF-TrkB signaling in the nucleus accumbens shell of mice has key role in methamphetamine withdrawal symptoms. *Transl Psychiatry* 5, e666.

Revest, J.-M., Le Roux, A., Roullot-Lacarrière, V., Kaouane, N., Vallée, M., Kasanetz, F., Rougé-Pont, F., Tronche, F., Desmedt, A., and Piazza, P.V. (2014). BDNF-TrkB signaling through Erk1/2 MAPK phosphorylation mediates the enhancement of fear memory induced by glucocorticoids. *Mol. Psychiatry* 19, 1001–1009.

Roberts, E., and Frankel, S. (1950). gamma-Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J. Biol. Chem.* 187, 55–63.

Robinson, T.E., and Kolb, B. (2004). Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1, 33–46.

Robinson, T.E., Gorny, G., Savage, V.R., and Kolb, B. (2002). Widespread but regionally specific effects of experimenter- versus self-administered morphine on dendritic spines in the nucleus accumbens, hippocampus, and neocortex of adult rats. *Synapse* 46, 271–279.

Rodier, M., Prigent-Tessier, A., Béjot, Y., Jacquin, A., Mossiat, C., Marie, C., and Garnier, P. (2014). Exogenous t-PA administration increases hippocampal mature BDNF levels. plasmin- or NMDA-dependent mechanism? *PLoS ONE* 9, e92416.

Roni, M.A., and Rahman, S. (2014). The effects of lobeline on nicotine withdrawal-induced depression-like behavior in mice. *Psychopharmacology* 231, 2989–2998.

- Rose, C.R., Blum, R., Pichler, B., Lepier, A., Kafitz, K.W., and Konnerth, A. (2003). Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells. *Nature* 426, 74–78.
- Rossi, S., De Capua, A., Tavanti, M., Calossi, S., Polizzotto, N.R., Mantovani, A., Falzarano, V., Bossini, L., Passero, S., Bartalini, S., et al. (2009). Dysfunctions of cortical excitability in drug-naïve posttraumatic stress disorder patients. *Biol. Psychiatry* 66, 54–61.
- Roth, F.C., Draguhn, A., Roth, F.C., and Draguhn, A. (2012). GABA Metabolism and Transport: Effects on Synaptic Efficacy. *Neural Plasticity* 2012, e805830.
- Rothman, J.E., and Orci, L. (1992). Molecular dissection of the secretory pathway. *Nature* 355, 409–415.
- Rothman, D.L., De Feyter, H.M., de Graaf, R.A., Mason, G.F., and Behar, K.L. (2011). ¹³C MRS studies of neuroenergetics and neurotransmitter cycling in humans. *NMR Biomed* 24, 943–957.
- Rowley, N.M., Madsen, K.K., Schousboe, A., and Steve White, H. (2012). Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control. *Neurochemistry International* 61, 546–558.
- Rudy, C.C., Hunsberger, H.C., Weitzner, D.S., and Reed, M.N. (2015). The Role of the Tripartite Glutamatergic Synapse in the Pathophysiology of Alzheimer’s Disease. *Aging Dis* 6, 131–148.
- Saarelainen, T., Hendolin, P., Lucas, G., Koponen, E., Sairanen, M., MacDonald, E., Agerman, K., Haapasalo, A., Nawa, H., Aloyz, R., et al. (2003). Activation of the TrkB Neurotrophin Receptor Is Induced by Antidepressant Drugs and Is Required for Antidepressant-Induced Behavioral Effects. *J. Neurosci.* 23, 349–357.
- Sanacora, G., Gueorguieva, R., Epperson, C.N., Wu, Y.-T., Appel, M., Rothman, D.L., Krystal, J.H., and Mason, G.F. (2004). Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression. *Arch. Gen. Psychiatry* 61, 705–713.
- Sarramon, C., Verdoux, H., Schmitt, L., and Bourgeois, M. (1999). [Addiction and personality traits: sensation seeking, anhedonia, impulsivity]. *Encephale* 25, 569–575.
- Saruta, J., Fujino, K., To, M., and Tsukinoki, K. (2012). Expression and Localization of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) mRNA and Protein in Human Submandibular Gland. *Acta Histochem Cytochem* 45, 211–218.
- Sattari, M., Routledge, P., and Mashayekhi, S. (2011). The influence of active transport systems on morphine -6-glucuronide transport in MDCKII and MDCK-PGP cells. *Daru* 19, 412–416.
- Saunders, B.T., Yager, L.M., and Robinson, T.E. (2013). Cue-Evoked Cocaine “Craving”: Role of Dopamine in the Accumbens Core. *J Neurosci* 33, 13989–14000.
- Schmidt, H.D., Sangrey, G.R., Darnell, S.B., Schassburger, R.L., Cha, J.-H.J., Pierce, R.C., and Sadri-Vakili, G. (2012). Increased brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in the ventral tegmental area during cocaine abstinence is associated with increased histone acetylation at BDNF exon I-containing promoters. *J. Neurochem.* 120, 202–209.
- Schousboe, A. (2000). Pharmacological and functional characterization of astrocytic GABA transport: a short review. *Neurochem. Res.* 25, 1241–1244.

- Schousboe, A., Bak, L.K., and Waagepetersen, H.S. (2013). Astrocytic Control of Biosynthesis and Turnover of the Neurotransmitters Glutamate and GABA. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4:102
- Schousboe, A., Scafidi, S., Bak, L.K., Waagepetersen, H.S., and McKenna, M.C. (2014). Glutamate Metabolism in the Brain Focusing on Astrocytes. *Adv Neurobiol* 11, 13–30.
- Schultz, W. (1998). Predictive Reward Signal of Dopamine Neurons. *Journal of Neurophysiology* 80, 1–27.
- Schultz, W. (2006). Behavioral Theories and the Neurophysiology of Reward. *Annual Review of Psychology* 57, 87–115.
- Schulz, S., Mayer, D., Pfeiffer, M., Stumm, R., Koch, T., and Höllt, V. (2004). Morphine induces terminal μ -opioid receptor desensitization by sustained phosphorylation of serine-375. *EMBO J* 23, 3282–3289.
- Schunck, R.V.A., Torres, I.L.S., Laste, G., de Souza, A., Macedo, I.C., Valle, M.T.C., Salomón, J.L.O., Moreira, S., Kuo, J., Arbo, M.D., et al. (2015). Protracted alcohol abstinence induces analgesia in rats: Possible relationships with BDNF and interleukin-10. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 135, 64–69.
- Segal, R.A., Bhattacharyya, A., Rua, L.A., Alberta, J.A., Stephens, R.M., Kaplan, D.R., and Stiles, C.D. (1996). Differential utilization of Trk autophosphorylation sites. *J. Biol. Chem.* 271, 20175–20181.
- Seib, L.M., and Wellman, C.L. (2003). Daily injections alter spine density in rat medial prefrontal cortex. *Neurosci. Lett.* 337, 29–32.
- Seidah, N.G., Benjannet, S., Pareek, S., Chrétien, M., and Murphy, R.A. (1996). Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases. *FEBS Lett.* 379, 247–250.
- Sepkuty, J.P., Cohen, A.S., Eccles, C., Rafiq, A., Behar, K., Ganel, R., Coulter, D.A., and Rothstein, J.D. (2002). A Neuronal Glutamate Transporter Contributes to Neurotransmitter GABA Synthesis and Epilepsy. *J Neurosci* 22, 6372–6379.
- Sepúlveda, J., Oliva, P., and Contreras, E. (2004). Neurochemical changes of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in the nucleus accumbens of rats after chronic administration of morphine. *European Journal of Pharmacology* 483, 249–258.
- Serra-Millàs, M. (2016). Are the changes in the peripheral brain-derived neurotrophic factor levels due to platelet activation? *World J Psychiatry* 6, 84–101.
- Shen, J., and Maruyama, I.N. (2012). Brain-derived neurotrophic factor receptor TrkB exists as a preformed dimer in living cells. *J Mol Signal* 7, 2.
- Shi, S.-S., Shao, S.-H., Yuan, B.-P., Pan, F., and Li, Z.-L. (2010). Acute stress and chronic stress change brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and tyrosine kinase-coupled receptor (TrkB) expression in both young and aged rat hippocampus. *Yonsei Med. J.* 51, 661–671.
- Shibata, S., Minamoto, Y., Ono, M., and Watanabe, S. (1994). Age-related impairment of food anticipatory locomotor activity in rats. *Physiology & Behavior* 55, 875–878.
- Shibayama, E., and Koizumi, H. (1996). Cellular localization of the Trk neurotrophin receptor family in human non-neuronal tissues. *Am J Pathol* 148, 1807–1818.

- Shigeri, Y., Seal, R.P., and Shimamoto, K. (2004). Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Research Reviews* 45, 250–265.
- Shors, T.J., Falduto, J., and Leuner, B. (2004). The opposite effects of stress on dendritic spines in male vs. female rats are NMDA receptor-dependent. *Eur J Neurosci* 19, 145–150.
- Sinha, R. (2008). Chronic Stress, Drug Use, and Vulnerability to Addiction. *Ann N Y Acad Sci* 1141, 105–130.
- Sinha, R. (2011). New findings on biological factors predicting addiction relapse vulnerability. *Curr Psychiatry Rep* 13, 398–405.
- Sklair-Tavron, L., Shi, W.X., Lane, S.B., Harris, H.W., Bunney, B.S., and Nestler, E.J. (1996). Chronic morphine induces visible changes in the morphology of mesolimbic dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11202–11207.
- Smith, H.S. (2009). Opioid Metabolism. *Mayo Clin Proc* 84, 613–624.
- Solinas, M., Chauvet, C., Thiriet, N., Rawas, R.E., and Jaber, M. (2008). Reversal of cocaine addiction by environmental enrichment. *PNAS* 105, 17145–17150.
- Song, M., Giza, J., Proenca, C.C., Jing, D., Elliott, M., Dincheva, I., Shmelkov, S.V., Kim, J., Schreiner, R., Huang, S.-H., et al. (2015). Slitrk5 mediates BDNF-dependent TrkB receptor trafficking and signaling. *Dev Cell* 33, 690–702.
- Spenger, C., Hyman, C., Studer, L., Egli, M., Evtouchenko, L., Jackson, C., Dahl-Jørgensen, A., Lindsay, R.M., and Seiler, R.W. (1995). Effects of BDNF on dopaminergic, serotonergic, and GABAergic neurons in cultures of human fetal ventral mesencephalon. *Exp. Neurol.* 133, 50–63.
- Spiga, S., Puddu, M.C., Pisano, M., and Diana, M. (2005). Morphine withdrawal-induced morphological changes in the nucleus accumbens. *Eur. J. Neurosci.* 22, 2332–2340.
- Sternini, C., Spann, M., Anton, B., Keith, D.E., Bunnett, N.W., Zastrow, M. von, Evans, C., and Brecha, N.C. (1996). Agonist-selective endocytosis of mu opioid receptor by neurons in vivo. *PNAS* 93, 9241–9246.
- Stevenson, C.W., and Gratton, A. (2003). Basolateral amygdala modulation of the nucleus accumbens dopamine response to stress: role of the medial prefrontal cortex. *Eur. J. Neurosci.* 17, 1287–1295.
- Sun, W.-L., Eisenstein, S.A., Zelek-Molik, A., and McGinty, J.F. (2015). A single brain-derived neurotrophic factor infusion into the dorsomedial prefrontal cortex attenuates cocaine self-administration-induced phosphorylation of synapsin in the nucleus accumbens during early withdrawal. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 18. doi: (2015).10.1093/ijnp/pyu049
- Surmeier, D.J. (2007). Dopamine and working memory mechanisms in prefrontal cortex. *The Journal of Physiology* 581, 885–885.
- Surmeier, D.J., Carrillo-Reid, L., and Bargas, J. (2011). Dopaminergic modulation of striatal neurons, circuits, and assemblies. *Neuroscience* 198, 3–18.
- Sussman, S., Ames, S.L., and Avol, E. (2015). Could Environmental Exposures Facilitate the Incidence of Addictive Behaviors? *Eval Health Prof* 38, 53–58.

- Suto, N., Wise, R.A., and Vezina, P. (2011). Dorsal as well as ventral striatal lesions affect levels of intravenous cocaine and morphine self-administration in rats. *Neurosci Lett* 493, 29–32.
- Swendsen, J., and Le Moal, M. (2011). Individual vulnerability to addiction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1216, 73–85.
- Thoma, P., and Daum, I. (2013). Comorbid substance use disorder in schizophrenia: A selective overview of neurobiological and cognitive underpinnings. *Psychiatry Clin Neurosci* 67, 367–383.
- Thomas, K., and Davies, A. (2005). Neurotrophins: A Ticket to Ride for BDNF. *Current Biology* 15, R262–R264.
- Timmusk, T., and Metsis, M. (1994). Regulation of BDNF promoters in the rat hippocampus. *Neurochemistry International* 25, 11–15.
- Timmusk, T., Palm, K., Metsis, M., Reintam, T., Paalme, V., Saarma, M., and Persson, H. (1993). Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron* 10, 475–489.
- Ting-A-Kee, R., and van der Kooy, D. (2012). *The Neurobiology of Opiate Motivation*. Cold Spring Harb Perspect Med 2012;2:a012096
- Tornatzky, W., and Miczek, K.A. (1999). Repeated limited access to i.v. cocaine self-administration: conditioned autonomic rhythmicity illustrating “predictive homeostasis.” *Psychopharmacology (Berl.)* 145, 144–152.
- Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J., and Dingledine, R. (2010). Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacol Rev* 62, 405–496.
- Trescot, A.M., Datta, S., Lee, M., and Hansen, H. (2008). Opioid pharmacology. *Pain Physician* 11, S133-153.
- Vallone, D., Picetti, R., and Borrelli, E. (2000). Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev* 24, 125–132.
- Verdejo-García, A., Fernandez-Serrano, M.J., and Tirapu-Ustarroz, J. (2013). Chapter 8 - Denial and Lack of Awareness in Substance Dependence: Insights from the Neuropsychology of Addiction A2 - Miller, Peter M. In *Principles of Addiction*, (San Diego: Academic Press), pp. 77–86.
- Vermehren-Schmaedick, A., Krueger, W., Jacob, T., Ramunno-Johnson, D., Balkowiec, A., Lidke, K.A., and Vu, T.Q. (2014). Heterogeneous intracellular trafficking dynamics of brain-derived neurotrophic factor complexes in the neuronal soma revealed by single quantum dot tracking. *PLoS ONE* 9, e95113.
- Vicario, A., Colliva, A., Ratti, A., Davidovic, L., Baj, G., Gricman, Ł., Colombrita, C., Pallavicini, A., Jones, K.R., Bardoni, B., et al. (2015). Dendritic targeting of short and long 3' UTR BDNF mRNA is regulated by BDNF or NT-3 and distinct sets of RNA-binding proteins. *Front Mol Neurosci* 8. doi: 10.3389/fnmol.2015.00062.
- Vollmayr, B., Faust, H., Lewicka, S., and Henn, F.A. (2001). Brain-derived-neurotrophic-factor (BDNF) stress response in rats bred for learned helplessness. *Mol. Psychiatry* 6, 471–474, 358.

- Wang, X.-F., Barbier, E., Chiu, Y.-T., He, Y., Zhan, J., Bi, G.-H., Zhang, H.-Y., Feng, B., Liu-Chen, L.-Y., Wang, J.B., et al. (2016). T394A Mutation at the μ Opioid Receptor Blocks Opioid Tolerance and Increases Vulnerability to Heroin Self-Administration in Mice. *J. Neurosci.* *36*, 10392–10403.
- Warren, B.L., Sial, O.K., Alcantara, L.F., Greenwood, M.A., Brewer, J.S., Rozofsky, J.P., Parise, E.M., and Bola  os-Guzmán, C.A. (2014). Altered gene expression and spine density in nucleus accumbens of adolescent and adult male mice exposed to emotional and physical stress. *Dev Neurosci* *36*, 250–260.
- Watson, F.L., Porcionatto, M.A., Bhattacharyya, A., Stiles, C.D., and Segal, R.A. (1999). TrkA glycosylation regulates receptor localization and activity. *J. Neurobiol.* *39*, 323–336.
- Weinshenker, D., and Schroeder, J.P. (2006). There and Back Again: A Tale of Norepinephrine and Drug Addiction. *Neuropsychopharmacology* *32*, 1433–1451.
- Weiss, F., Lorang, M.T., Bloom, F.E., and Koob, G.F. (1993). Oral alcohol self-administration stimulates dopamine release in the rat nucleus accumbens: genetic and motivational determinants. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *267*, 250–258.
- Whistler, J.L., Chuang, H.H., Chu, P., Jan, L.Y., and von Zastrow, M. (1999). Functional dissociation of mu opioid receptor signaling and endocytosis: implications for the biology of opiate tolerance and addiction. *Neuron* *23*, 737–746.
- Widnell, K.L., Self, D.W., Lane, S.B., Russell, D.S., Vaidya, V.A., Miserendino, M.J., Rubin, C.S., Duman, R.S., and Nestler, E.J. (1996). Regulation of CREB expression: in vivo evidence for a functional role in morphine action in the nucleus accumbens. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *276*, 306–315.
- Williams, J.T., Christie, M.J., and Manzoni, O. (2001). Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol. Rev.* *81*, 299–343.
- Wise, R.A., and Gardner, E.L. (2002). Functional Anatomy of Substance-Related Disorders. In *Biological Psychiatry*, H.D.H. of the P.D. of Psychiatry, J.A. den B. of B. Psychiatry, and P. Willner, eds. (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 509–522.
- Witten, I.B., Steinberg, E.E., Lee, S.Y., Davidson, T.J., Zalocusky, K.A., Brodsky, M., Yizhar, O., Cho, S.L., Gong, S., Ramakrishnan, C., et al. (2011). Recombinase-driver rat lines: tools, techniques, and optogenetic application to dopamine-mediated reinforcement. *Neuron* *72*, 721–733.
- Wolffgramm, J., and Heyne, A. (1995). From controlled drug intake to loss of control: the irreversible development of drug addiction in the rat. *Behav. Brain Res.* *70*, 77–94.
- Wong, J., and Garner, B. (2012). Evidence that truncated TrkB isoform, TrkB-Shc can regulate phosphorylated TrkB protein levels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *420*, 331–335.
- Wong, Y.-H., Lee, C.-M., Xie, W., Cui, B., and Poo, M. (2015). Activity-dependent BDNF release via endocytic pathways is regulated by synaptotagmin-6 and complexin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *112*, E4475–4484.
- Woo, N.H., and Lu, B. (2009). BDNF in synaptic plasticity and memory. *Intracellular Communication In The Nervous System*. Bethesda, Maryland, USA: NIH 135–143.

- Woo, N.H., Teng, H.K., Siao, C.-J., Chiaruttini, C., Pang, P.T., Milner, T.A., Hempstead, B.L., and Lu, B. (2005). Activation of p75^{NTR} by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat. Neurosci.* *8*, 1069–1077.
- Woronowicz, A., Cawley, N.X., Chang, S.-Y., Koshimizu, H., Phillips, A.W., Xiong, Z.-G., and Loh, Y.P. (2010). Carboxypeptidase e knock-out mice exhibit abnormal dendritic arborization and spine morphology in cns neurons. *J Neurosci Res* *88*, 64–72.
- Wu, D., Kang, Y.-S., Bickel, U., and Pardridge, W.M. (1997). Blood-Brain Barrier Permeability to Morphine-6-Glucuronide is Markedly Reduced Compared with Morphine. *Drug Metab Dispos* *25*, 768–771.
- Xi, Z.-X., Ramamoorthy, S., Shen, H., Lake, R., Samuvel, D.J., and Kalivas, P.W. (2003). GABA Transmission in the Nucleus Accumbens Is Altered after Withdrawal from Repeated Cocaine. *J. Neurosci.* *23*, 3498–3505.
- Xi, Z.-X., Li, X., Li, J., Peng, X.-Q., Song, R., Gaál, J., and Gardner, E.L. (2013). Blockade of dopamine D3 receptors in the nucleus accumbens and central amygdala inhibits incubation of cocaine craving in rats. *Addict Biol* *18*, 665–677.
- Xu, N.-J., Bao, L., Fan, H.-P., Bao, G.-B., Pu, L., Lu, Y.-J., Wu, C.-F., Zhang, X., and Pei, G. (2003). Morphine withdrawal increases glutamate uptake and surface expression of glutamate transporter GLT1 at hippocampal synapses. *J. Neurosci.* *23*, 4775–4784.
- Yoshimura, H., Îda, S., Oguri, K., and Tsukamoto, H. (1973). Biochemical basis for analgesic activity of morphine-6-glucuronide—I. Penetration of morphine-6-glucuronide in the brain of rats. *Biochemical Pharmacology* *22*, 1423–1430.
- You, C., Zhang, H., Sakharkar, A.J., Teppen, T., and Pandey, S.C. (2014). Reversal of deficits in dendritic spines, BDNF and Arc expression in the amygdala during alcohol dependence by HDAC inhibitor treatment. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* *17*, 313–322.
- Zhang, J., Zhang, X.Y., Su, H., Tao, J., Xie, Y., Han, B., Lu, Y.L., Wei, Y.D., Sun, H.W., Wang, Y., et al. (2014). Increased serum brain-derived neurotrophic factor levels during opiate withdrawal. *Neurosci. Lett.*
- Zhang, Q., Liu, Q., Li, T., Liu, Y., Wang, L., Zhang, Z., Liu, H., Hu, M., Qiao, Y., and Niu, H. (2016). Expression and colocalization of NMDA receptor and FosB/ Δ FosB in sensitive brain regions in rats after chronic morphine exposure. *Neurosci. Lett.* *614*, 70–76.
- Zhang, X.Y., Chen, D.C., Xiu, M.H., Luo, X., Zuo, L., Haile, C.N., Kosten, T.A., and Kosten, T.R. (2012). BDNF Val66Met variant and smoking in a Chinese population. *PLoS ONE* *7*, e53295.
- Zhao, H., Loh, H.H., and Law, P.Y. (2006). Adenylyl Cyclase Superactivation Induced by Long-Term Treatment with Opioid Agonist Is Dependent on Receptor Localized within Lipid Rafts and Is Independent of Receptor Internalization. *Mol Pharmacol* *69*, 1421–1432.
- Zhao, X., Li, Y., Peng, T., Seese, R.R., and Wang, Z. (2011). Stress impairs consolidation of recognition memory after blocking drug memory reconsolidation. *Neurosci. Lett.* *501*, 50–54.
- Zheng, F., Zhou, X., Luo, Y., Xiao, H., Wayman, G., and Wang, H. (2011). Regulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor Exon IV Transcription through Calcium Responsive Elements in Cortical Neurons. *PLoS One* *6*(12):e28441.

Zheng, F., Zhou, X., Moon, C., and Wang, H. (2012). Regulation of brain-derived neurotrophic factor expression in neurons. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 4, 188–200.

Zhou, B., Cai, Q., Xie, Y., and Sheng, Z.-H. (2012). Snapin recruits dynein to BDNF-TrkB signaling endosomes for retrograde axonal transport and is essential for dendrite growth of cortical neurons. *Cell Rep* 2, 42–51.

Zhou, J., Ping, F., Lv, W., Feng, J., and Shang, J. (2014). Interleukin-18 directly protects cortical neurons by activating PI3K/AKT/NF- κ B/CREB pathways. *Cytokine* 69, 29–38.